

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Análisis molecular y genético de mecanismos implicados en
el aclaramiento de β -amiloide a través de los plexos
coroideos en la enfermedad de Alzheimer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Teodoro Vargas Alonso

DIRECTOR:

Eva María, dir Carro Díaz

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



532764112X

T616.894-053.9

VAR

ava

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID**

**ANÁLISIS MOLECULAR Y GENÉTICO DE
MECANISMOS IMPLICADOS EN EL
ACLARAMIENTO DE β -AMILOIDE A TRAVÉS DE
LOS PLEXOS COROIDEOS EN LA ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER**

626514965

Tesis presentada por **Teodoro Vargas Alonso** para optar al grado de Doctor por la Universidad
Complutense de Madrid



Madrid, 2010

i39566468

La Dra. EVA MARÍA CARRO DÍAZ, Científica-investigadora del Laboratorio de Neurociencias del Centro de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, como directora del presente trabajo

CERTIFICA QUE:

La tesis titulada;

**“ANÁLISIS MOLECULAR Y GENÉTICO DE MECANISMOS
IMPLICADOS EN EL ACLARAMIENTO DE β -AMILOIDE A TRAVÉS DE
LOS PLEXOS COROIDEOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

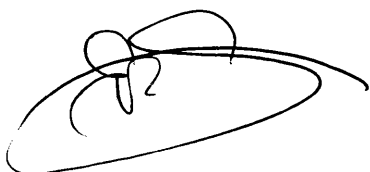
Presentada por **TEODORO VARGAS ALONSO**, ha sido realizada en este Servicio, y en mi opinión, reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste firmo la presente en Madrid a 27 de Enero de 2010

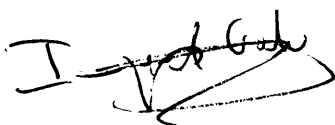
VºBº Directora de tesis

VºBº Tutor de tesis

Doctorando



Dra. Eva Maria Carro Díaz



Dr. Ismael Galve Roperh

Teodoro Vargas Alonso

La presente tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Neurociencias del Centro de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid.

Parte de esta tesis ha sido publicada:

- Vargas T*, Ugalde C*, Spuch C, Antequera D, Morán MJ, Martín MA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E.

"Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis" Neurobiol Aging. 2008 Oct 4. [Epub ahead of print]

*These authors have contributed equally to this work

- Antequera D*, Vargas T*, Ugalde C, Spuch C, Molina JA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E.

"Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease" Neurobiol Dis. 2009 Oct;36(1):42-50. Epub 2009 Jul 14.

*These authors have contributed equally to this work

- Vargas T*, Antequera D*, Ugalde C, Spuch C, Carro E.

"Gelsolin restores Abeta-induced alterations in choroid plexus epithelium" J Biomed Biotechnol. 2010 Jan 19.

*These authors have contributed equally to this work

- Vargas T*, Bullido MJ*, Martínez-García A, Antequera D, Clarimón J, Rosich-Estrago M, Martín-Requero A, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Combarros O, Gómez-Isla T, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Carro E.

"A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer's disease risk" Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5. [Epub ahead of print]

*These authors have contributed equally to this work

- Vargas T*, Martínez-García A*, Antequera D, Vilella-Cuadrada E, Clarimón J, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Frank A, Rosich-Estrago M, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Gómez-Isla T, Combarros O, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Bullido MJ, Carro E.

"IGF-1 gene variability is associated with an increased risk for AD" Annals of Neurology. Enviado. Pendiente de publicación

*These authors have contributed equally to this work

Además, ha dado lugar a las siguientes comunicaciones en congresos nacionales e internacionales:

-Poster presentado en el “Fifth International Congress on Vascular Dementia”, Budapest, Hungary, 8-11 Noviembre de 2007:

“Protection by gelsolin on amyloid-B-induced toxicity in the blood-CSF-brain barrier: Apoptotic pathways.”

T. Vargas, C. Spuch, D. Antequera, C. Ugalde, J.A. Molina, F. Bermejo, E. Carro

- Poster presentado en el “Alzheimer’s Association 11th International Conference on Alzheimer’s Disease - ICAD 2008” (poster session: Molecular mechanisms of neurodegeneration. Beta-amyloidosis), Chicago, Illinois, USA, 26-31 Julio de 2008:

“A β Accumulation in Choroid Plexus of Human Alzheimer’s Disease Brain Is Associated With Mitochondrial-Induced Apoptosis and Blood-CSF–Barrier Disruption”

T. Vargas, C. Ugalde, C. Spuch, D. Antequera, M. Moran, M.A. Martin, I. Ferrer, F. Bermejo, E. Carro

Periodical articles: “Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association”. July 2008 (Vol. 4, Issue 4, Page T355)

-Poster presentado en el “2nd World Congress on Controversies in Neurology (CONy)” (poster session: Neurodegenerative Diseases), Athens, Greece, 23-26 Octubre de 2008:

“A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer’s disease”

Carro E , **Vargas T**, Bullido MJ, Martínez-García A, Antequera D, Clarimon J, Gómez-Isla T, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F.

-Poster presentado en el “Alzheimer’s Association 12th International Conference on Alzheimer’s Disease - ICAD 2009” (poster session: Molecular mechanisms of neurodegeneration. Beta-amyloidosis), Vienna, Austria, 12-16 Julio de 2009:

“A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer’s disease risk”

Vargas T, Bullido MJ, Martínez-García A, Antequera D, Clarimón J, Rosich-Estrago M, Martín-Requero A, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Combarros O, Gómez-Isla T, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Carro E.

- Poster presentado en el “Sixth International Congress on Vascular Dementia” Barcelona, Spain, 19-22 Noviembre 2009:

“A megalin polymorphism associated with increased Alzheimer’s disease risk”

Vargas T, Bullido MJ, Martínez-García A, Antequera D, Clarimon J, Rosich-Estrago M, Martín-Requero A, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Combarros O, Gómez-Isla T, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Carro

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la culminación de esta tesis doctoral.

A todas las personas que han colaborado en los artículos que integran esta tesis, en especial a los co-autores, y al resto de personas que han participado en los respectivos trabajos.

A todos los compañeros de trabajo, sin cuya colaboración, dedicación y excelente trabajo hubiese sido imposible la realización de esta tesis.

A todas las personas con las que compartimos laboratorio, por su ayuda, su compañía, sus ánimos, por los buenos ratos que hemos pasado juntos y sobre todo sus risas.

Al resto de personas del Centro de investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre que han participado directa o indirectamente en este trabajo, por su generosidad a la hora de ayudarme.

Y por supuesto, mi más profundo y sincero agradecimiento a la directora de esta tesis, la Dra. Eva Carro, a quien admiro por su gran capacidad de trabajo, y aprecio como persona. Gracias por haber confiado en mí desde el primer día.

Gracias a todos aquellos que en alguna ocasión estuvieron presentes, e hicieron de mi paso por este grupo toda una experiencia.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fases de la EA.....	3
Figura 2: Procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico del APP.....	7
Figura 3: Frecuencias de alelos y genotipos ApoE en la EA.....	10
Figura 4: Lesiones macroscópicas en la EA.....	15
Figura 5: Pruebas clínicas para determinar lesiones macroscópicas en la EA.....	17
Figura 6: Procesamiento enzimático del APP.....	18
Figura 7: Diagrama esquemático del APP y sus principales derivados proteolíticos.....	19
Figura 8: Secuencia hipotética de etapas patogénicas en la EA.....	21
Figura 9: Placas neuríticas de amiloide.....	23
Figura 10: Barrera hematoencefálica.....	25
Figura 11: Angiopatía amiloide en vasos meníngeos y parenquimales.....	26
Figura 12: Esquema de plexos coroideos.....	27
Figura 13: Fotografía de plexos coroideos.....	28
Figura 14: Fotografía de ovillos neurofibrilares.....	30
Figura 15: Proteína tau en la EA.....	31
Figura 16: Sitios de fosforilación de tau.....	32
Figura 17: Familia de receptores de lipoproteínas (LDLR).....	42
Figura 18: Ligandos del LRP2/megalina.....	45
Figura 19: Doble papel del IGF-I en el desarrollo de la EA.....	54
Figura 20: Secuencia hipotética de eventos que llevan a la muerte celular tras la acumulación de A β en las células epiteliales de los plexos coroideos.....	146

ABREVIATURAS

A β : Proteína β -amiloide

A β ₄₀: Isoforma β -amiloide de 40 aminoácidos

A β ₄₂: Isoforma β -amiloide de 42 aminoácidos

α 2M: α -2Macroglobulina

Aph-1: Alfaproteína 1

ApoA: Apolipoproteína A

ApoB: Apolipoproteína B

ApoE: Apolipoproteína E

ApoH: Apolipoproteína H

ApoJ: Apolipoproteína J

APP: Proteína precursora de amiloide

bFGF: Factor básico de crecimiento
de fibroblastos

BHE: Barrera hematoencefálica

C1q: Componente C1q del sistema del
complemento

Ca²⁺: Calcio

CDK5: Quinasa dependiente de ciclina 5

CLU: Gen clusterina o *APOJ*

EA: Enfermedad de Alzheimer

EGF: Factor de crecimiento epidermal

GH: Hormona de crecimiento

GSK3: Quinasa glicógeno sintasa 3

GSN: Gen gelsolina

HSV-1: Virus herpes simplex tipo 1

IGF-I: Factor de crecimiento similar a la
insulina tipo I

IGF-II: Factor de crecimiento similar a la
insulina tipo II

IGFBPs: Proteínas de unión a IGF

Kb: Kilobase

KDa: Kilodalton

LCR: Líquido cefaloraquídeo

LRP1: Proteína relacionada con el receptor
de lipoproteínas de baja densidad-1

LRP2/megalina: Proteína relacionada con el
receptor de lipoproteínas de baja densidad-2

MAPK: Proteinquinasa activada por
mitógenos

Nestn: Nicastrina

PAI-I: Inhibidor del activador de
plasminógeno I

PAP-1: Proteína asociada a pancreatitis

Pen-2: Potenciador 2 de Psen1

PHF: Filamentos pareados helicoidales

PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa

PICALM: Gen de la proteína de ensamblaje
de clatrina de unión a fosfatidilinositol

PSEN1: Gen presenilina 1

Psen1: Proteína presenilina 1

PSEN2: Gen presenilina 2

Psen2: Proteína presenilina 2

PTH: Hormona paratiroidea

RAP: Proteína asociada a receptor

ROS: Especies reactivas de oxígeno

sLRP: Proteína LRP soluble

SNC: Sistema nervioso central

TC-B12: Transcobalamina-vitamina B12

TGF α : Factor de crecimiento transformante α

TGF β : Factor de crecimiento transformante β

TNF: Factor de necrosis tumoral

tPA: Activador tisular de plasminógeno

TTR: Gen transtirretina

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	1
1.1. DEFINICIÓN E HISTORIA.....	1
1.2. ETIOPATOLOGÍA.....	5
1.2.1. Enfermedad de Alzheimer Familiar.....	6
1.2.2. Enfermedad de Alzheimer Esporádica.....	9
2. ALTERACIONES PATOGÉNICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	14
2.1. NEUROPATOLOGÍA.....	14
2.2. β -AMILOIDE.....	17
2.2.1. Placas neuríticas.....	22
2.2.2. Cambios en la barrera hematoencefálica.....	24
2.2.3. Cambios en la barrera sangre-LCR.....	26
2.3. HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU.....	30
2.4. INFLAMACIÓN.....	34
2.5 CAMBIOS Y PÉRDIDA DE CONEXIONES SINÁPTICAS.....	36
2.6. ESTRÉS OXIDATIVO, ALTERACIONES MITOCONDRIALES Y MUERTE NEURONAL.....	38
3. ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS INVOLUCRADOS EN EL ACLARAMIENTO DE β-AMILOIDE	40
3.1. MEGALINA Y OTROS RECEPTORES DE LA FAMILIA DE RECEPTORES LDL.....	42
3.1.1. LRP2/Megalina.....	42
3.1.2. LRP1.....	46
3.2. PROTEÍNAS DE UNIÓN AL β -AMILOIDE.....	48
3.2.1. Gelsolina.....	48
3.2.2. Transtirretina.....	49
3.3. IGF-I.....	51

<u>OBJETIVOS</u>	56
-------------------------------	----

<u>RESULTADOS</u>	57
--------------------------------	----

1. ALTERACIONES PATOLÓGICAS ASOCIADAS AL PROCESO DE ACLARAMIENTO DEL β-AMILOIDE A NIVEL DE LOS PLEXOS COROIDEOS	
1.1. Alteraciones relacionadas con supervivencia celular - Artículo 1	57
Artículo 2	71
1.2. Alteraciones estructurales - Artículo 3	81
2. GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE β-AMILOIDE COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	105
2.1. Polimorfismos en el gen <i>LRP2/Megalina</i> - Artículo 4	105
2.2. Polimorfismos en los genes <i>GSN</i> y <i>TTR</i> - Artículo 5	114
2.3. Polimorfismos en el gen <i>IGF-I</i> - Artículo 5	114

<u>DISCUSIÓN</u>	143
-------------------------------	-----

1. ALTERACIONES PATOLÓGICAS ASOCIADAS AL PROCESO DE ACLARAMIENTO DEL β-AMILOIDE A NIVEL DE LOS PLEXOS COROIDEOS	
1.1. Alteraciones relacionadas con supervivencia celular - Artículo 1	143
Artículo 2	147
1.2. Alteraciones estructurales - Artículo 3	149
2. GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE β- AMILOIDE COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	151
2.1. Polimorfismos en el gen <i>LRP2/Megalina</i> - Artículo 4	151
2.2. Polimorfismos en los genes <i>GSN</i> y <i>TTR</i> - Artículo 5	154
2.3. Polimorfismos en el gen <i>IGF-I</i> - Artículo 5	154

<u>CONCLUSIONES</u>	157
----------------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	159
----------------------------------	-----

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1. DEFINICIÓN E HISTORIA

La EA es un grave proceso neurodegenerativo cuya prevalencia aumenta con la vejez. Fue descrito por primera vez por el neuropatólogo y psiquiatra alemán Alois Alzheimer (1864-1915) quien en noviembre de 1901, describió en detalle los síntomas y el progreso de degeneración mental en una mujer (Augusta D.) de 51 años de edad. Los síntomas de la paciente incluían alteraciones cognitivas, desorientación, afasia, alucinaciones y comportamiento impredecible. La mujer murió en abril de 1906 y en la autopsia el examen anatomopatológico reveló atrofia cerebral global y cambios característicos en sus estructuras internas, tales como “parches y “nudos de fibras”, fundamentalmente en las neuronas corticales, unas estructuras características que posteriormente fueron identificadas como placas seniles o neuríticas y ovillos neurofibrilares.

Después de la muerte de la paciente, Alois Alzheimer expuso un resumen del caso en la conferencia de Psiquiatría en Tübingen, Alemania, el día 3 de noviembre de 1906, titulando su exposición “Sobre un proceso peculiar de enfermedad de la corteza cerebral” (Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde). En 1910, Kraepelin sugirió para esta enfermedad el término de “Enfermedad de Alzheimer” (Moller y cols. 1998).

El aumento en la esperanza de vida que se ha dado en el siglo XX ha provocado que cada vez haya un número mayor de personas que alcanzan la edad en la que las enfermedades neurodegenerativas son más comunes. La EA es la más frecuente de las enfermedades neurológicas causantes de demencia que se dan fundamentalmente en las edades avanzadas, constituyendo el 50-60% de todas las demencias (Selkoe 2001a) siguiéndole en frecuencia la demencia vascular, la demencia con cuerpos de Lewy y una larga lista de enfermedades menos comunes.

Hoy en día, con el término demencia se identifica un síndrome caracterizado por deterioro intelectual en adultos que es suficientemente grave como para interferir en las relaciones sociales (es importante diferenciar la demencia de las pequeñas pérdidas de memoria que se dan durante el envejecimiento normal). Los cambios cognitivos incluyen no sólo fallos de memoria, sino también en otras áreas cognitivas, como en el uso del lenguaje, percepción, praxis, capacidad para llevar a cabo actividades de la vida cotidiana, resolver problemas, pensar de manera abstracta y realizar juicios, entre otras cosas. Pueden darse episodios paranoides, y también irritabilidad, inquietud e

incluso agresiones verbales y/o físicas a otras personas, normalmente del ambiente familiar, especialmente cuando la demencia avanza y el paciente nota una creciente pérdida de control sobre su entorno (Katzman 1986).

La EA se define clínicamente como una demencia con un declive cognitivo múltiple cuya prevalencia aumenta con la edad. Esta prevalencia se estima que es de aproximadamente un 1% en la población mundial de 60 a 64 años (Fratiglioni y cols. 1999; Nestor y cols. 2004; Blennow y cols. 2006), y un 5% en los sujetos mayores de 65 años. El número de casos se dobla cada 4 ó 5 años hasta llegar a un tercio de la población mayor de 85 años (prevalencia de 24-33%) y la mitad de la población de 95 o más años (Fratiglioni y cols. 1999; Nestor y cols. 2004).

En España se calculan unos 600.000 casos, 6.000.000 en la Unión Europea y unos 15 millones en el mundo occidental desarrollado, representando la tercera enfermedad más costosa económicamente después de las enfermedades cardíacas y el cáncer y la cuarta causa de incapacidad a nivel mundial. En España constituye la décima causa de mortalidad, por lo que ha sido nombrada como la epidemia silenciosa del siglo XX.

Clínicamente produce los síntomas ya descritos por Alois Alzheimer y patológicamente se caracteriza por las lesiones también descritas en la autopsia de la primera paciente de la enfermedad: las placas neuríticas y los ovillos neurofibrilares, que, aunque son comunes en el proceso normal del envejecimiento, son considerablemente menos numerosas y están menos distribuidas en cerebros de individuos clínicamente normales que en los de individuos con EA. Dichas lesiones histológicas hoy por hoy continúan siendo los marcadores característicos de la enfermedad (Lendon y cols. 1997; Goedert y Spillantini 2006).

Las regiones cerebrales afectadas con placas y ovillos presentan pérdida de sinapsis y muerte neuronal, y, paralelamente, se puede observar una reducción en el tamaño del cerebro; este efecto se observa fundamentalmente en las regiones implicadas en control del comportamiento emocional y en procesos de aprendizaje y memoria, como son los lóbulos frontal y temporal (Mattson 2004).

Aunque existen criterios que permiten discriminar en vida a los pacientes afectados como casos probables de Alzheimer, los más aceptados son los criterios NINCDS-ADRA (McKahn y cols. 1984), el diagnóstico definitivo de EA requiere un examen post-mortem del cerebro que revele un número suficiente de placas y ovillos que permitan calificar a ese cerebro como afectado por EA.

El curso de la enfermedad suele durar aproximadamente de 2 a 20 años (con una media de 8 años) en que los pacientes sufren una pérdida de memoria progresiva y de otras funciones cognitivas, incluyendo los fenómenos de apraxia, afasia y agnosia (Price 1986; Selkoe 1989) que en los últimos estadios imposibilitan al paciente para realizar por sí solo las actividades de la vida diaria.

Así, en una primera fase, los pacientes pierden la memoria a corto plazo, para progresivamente ir reduciendo su capacidad de atención, y posteriormente su memoria a largo plazo. Son característicos los problemas en el uso del lenguaje, entre los que destacan el empleo de un léxico vago, con frases inacabadas y plagadas de expresiones hechas.

En fases más avanzadas, los procesamiento visual y espacial van deteriorándose, afectando ya al desarrollo de las actividades de la vida diaria. Todos estos cambios cognitivos suelen ir acompañados de otros no cognitivos, siendo los más característicos de las primeras fases la ansiedad y la depresión. Más adelante, se producen alteraciones de la personalidad que pueden variar de pasividad a hostilidad, capacidad de expresión emocional disminuida, terquedad o recelo. En estas últimas etapas, los afectados pierden prácticamente su capacidad de movimiento. La muerte suele sobrevenir por una causa secundaria como neumonía u otras.

FASES DE LA EA:

La presentación clínica de la EA viene definida por un curso lento y progresivo y por un perfil clínico característico, con una sucesión típica y relativamente predecible de síntomas. Se pueden distinguir las siguientes fases, representadas en la Figura 1.

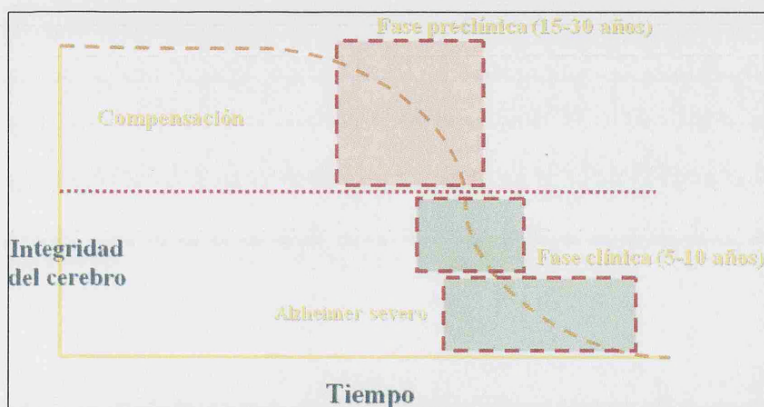


Figura 1: Fases de la EA: Desarrollo de la EA representando la pérdida de integridad y funciones cerebrales con respecto al tiempo. Se puede observar cómo se puede dividir en 2 fases, preclínica y clínica, y dentro de ésta última se puede diagnosticar una EA leve, moderada o severa.

Fase preclínica

Los problemas cognitivos y los síntomas depresivos suelen aparecer varios años antes del diagnóstico clínico. Los fallos de la memoria son los más frecuentes, siendo generalmente leves y detectándose sólo mediante una exploración de la memoria con test estandarizados.

Igualmente, la depresión mayor y la distimia pueden presentarse también antes del inicio del deterioro cognitivo en la EA.

Fases clínicas

- **EA en estadio de deterioro cognitivo leve sin demencia**

Los pacientes presentan una pérdida de memoria episódica caracterizada por una disminución en la capacidad de retención de nuevos recuerdos en la memoria reciente. Los test de aprendizaje verbal (recuerdo de una historia o de una lista de palabras) son los más útiles en la evaluación de estos pacientes, que por definición tienen un Mini-Mental normal (test usado para detectar y evaluar la progresión del trastorno cognitivo asociado a enfermedades neurodegenerativas como la EA) y en los que hay que aplicarles un test específico para evaluar su memoria.

- **EA en fase de demencia leve**

Se considera que un paciente con EA entra en fase de demencia ligera cuando aparecen los primeros signos de fracaso funcional en la vida social normal. El indicador que marca el paso de un deterioro cognitivo ligero y la demencia ligera es el déficit en las actividades funcionales de la vida diaria (AVD), más que los puntajes en los test cognitivos. La pérdida de capacidad para realizar las actividades diarias se inicia por las tareas más complejas, progresando hasta las actividades más básicas como el aseo. La amnesia que presentan los pacientes con EA en fase de demencia ligera se caracteriza por un déficit grave en la memoria episódica con pérdida de la capacidad de codificación y almacenamiento de nuevos recuerdos junto a una relativa preservación de la capacidad de recuperación. En los test cognitivos tipo Mini-Mental estos pacientes suelen puntuar por encima de 20/30 puntos, con amplia variabilidad según la edad y nivel escolar. En esta fase los pacientes no suelen tener alteraciones de conducta y la exploración neurológica es normal.

- **EA en fase moderada**

- Forma leve-moderada

La transición entre demencia leve y moderada no es brusca, sino gradual. Durante un período de varios años, los pacientes presentan signos intermedios entre las categorías leve y moderada. El parámetro que define la situación es igualmente el déficit en las actividades funcionales de la vida diaria. Estos pacientes todavía pueden realizar ciertas actividades rutinarias pero bajo una cierta supervisión. Los pacientes no presentan trastornos conductuales graves, aunque pueden aparecer ideas delirantes y manías como esconder objetos.

- Estadío demencia moderada

A nivel funcional se considera que la demencia entra en fase moderada cuando el paciente precisa ayuda para sus necesidades básicas de vestido y aseo. A nivel de lenguaje se puede detectar una afasia de tipo anómico con repetición y comprensión relativamente conservados. Los pacientes presentan apraxias ideatoria e ideomotora progresivas. A nivel de las funciones visuoperceptivas los pacientes muestran una agnosia visual de tipo asociativo que les impide reconocer estímulos visuales. Hay incapacidad para captar el significado de conjunto en escenas dibujadas, no reconocen entornos tipo casas, habitaciones, calles, etc., por lo que pueden perderse con facilidad. Tampoco reconocen caras de personas (prosopagnosia), dando lugar a falsos reconocimientos. Se presentan alteraciones conductuales, con inquietud y reacción con enfado cuando los cuidadores les piden que hagan algo que ellos no desean hacer, lo que puede dar lugar a discusiones y aumento de la agitación. Son frecuentes las ideas delirantes. La exploración neurológica puede ser normal o bien mostrar positividad en los reflejos regresivos (prensión, glabellar) y parkinsonismo con lentitud en la marcha. Puede haber mioclonías y crisis epilépticas.

- **EA en fase de demencia grave**

Los pacientes precisan ayuda para todas las necesidades básicas de la vida diaria. Hay que vestirlos y desvestirlos, asearlos, acompañarlos al baño y darles de comer. En esta etapa inician una incontinencia urinaria, sobre todo nocturna. Pueden tener reacciones de enfado y agitación al obligarles al aseo. Apenas comprenden el lenguaje complejo, tienen anomia intensa y el lenguaje espontáneo está muy reducido.

La etapa terminal de la EA es un estado de desconexión total del medio externo, grados variables de estupor y rigidez generalizada con tetraparesia en flexión. Los pacientes fallecen por debilitamiento progresivo y complicaciones asociadas.

1.2. ETIOPATOLOGÍA

La etiología de la enfermedad es múltiple y se puede clasificar en función de la edad de aparición de los síntomas o en función de la forma de herencia. En cuanto a la edad, se distingue entre formas preseniles (o de aparición precoz, antes de los 60-65 años) y seniles (o de aparición tardía) con aparición de los síntomas a partir de los 60-65 años.

En cuanto a la forma de herencia, se distinguen la EA familiar o monogénica, y la EA esporádica.

1.2.1. Enfermedad de Alzheimer Familiar

La forma familiar sigue un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia prácticamente del 100% y es provocada por mutaciones en los genes que codifican para la proteína precursora de amiloide (APP) (Goate y cols. 1991), presenilina 1 (Psen1) (Sherrington y cols. 1995) y/o presenilina 2 (Psen2) (Levy-Lahad y cols. 1995) que son responsables del 1-5% (Corder y cols. 1993) de los casos y que suelen tener presentación presenil.

Las mutaciones en *PSEN1* originan una forma más agresiva que las mutaciones en *PSEN2*, en la que los síntomas aparecen antes de los 50 años y causa la muerte aproximadamente a los 60 años de edad. La frecuencia de aparición de mutaciones en *PSEN1* y *PSEN2* es de 2-3% y 0,5% del total de casos de EA de aparición precoz, respectivamente (Richard y Amouyel 2001). Las mutaciones en APP afectan a muy pocas familias en el mundo y se ha estimado que sólo representan el 0,4% de los casos de EA (Richard y Amouyel 2001), pero su aparición tiene severas consecuencias biológicas. La edad de aparición de la enfermedad en estas familias oscila entre los 39 y 67 años y la penetrancia es del 100% en los portadores.

Mutaciones en alguno de estos tres genes son responsables de la mayor parte de los casos de EA de aparición temprana y, a pesar de que representan un porcentaje muy pequeño del total de los casos, su descubrimiento es un gran avance para comprender la enfermedad (Hardy 1997; Pericak-Vance y cols. 2000). Podemos encontrar un listado de mutaciones en estos genes en las páginas web <http://www.molgen.ua.ac.be/> y <http://www.alzforum.org/>.

Proteína precursora de amiloide (APP)

Como ya se ha indicado, el componente mayoritario de las placas neuríticas es un pequeño péptido de 40 - 43 aminoácidos que se denominó péptido β -amiloide ($A\beta$). La secuencia del péptido no mostró homología con proteínas conocidas hasta entonces, pero permitió aislar un gen que codificaba para la proteína que contenía en su secuencia el péptido $A\beta$; este gen se ha mapeado en el cromosoma 21 y la proteína se denominó “Proteína Precursora del Amiloide” (Glenner y Wong 1984).

El gen *APP* se encuentra en el cromosoma 21, localización 21q21.3. Contiene 18 exones y puede producir hasta 8 isoformas de la proteína por distintos procesamientos de su ARN mensajero, que puede sufrir el procesamiento alternativo de los exones 7, 8 y 15. Las isoformas que se expresan principalmente en las neuronas siempre contienen el exón 15 y son más amiloidogénicas que las

isoformas no neuronales. La isoforma más larga tiene 770 aminoácidos, el *splicing* del exón 7 da lugar a una isoforma de 695 aminoácidos que se expresa fundamentalmente en cerebro y el *splicing* del exón 8 da lugar a una isoforma de 751 aminoácidos que, aunque también se puede expresar en el cerebro, es más común en tejidos no neuronales (Rocchi y cols. 2003). Aunque se desconoce la función del APP con certeza, el análisis de su estructura primaria sugiere que APP puede ser un receptor de superficie glicosilado (Kang y cols. 1987).

Además, el análisis de la expresión de esta proteína durante el desarrollo del cerebro sugiere que podría ser importante en la maduración del SNC, ya que parece estar involucrada en la formación y en el mantenimiento de conexiones sinápticas y plasticidad neuronal (Kirazov y cols. 2001). El APP también juega un papel importante en la respuesta al estrés y en la regulación de daños en el sistema nervioso (Panegyres 2001).

APP es una proteína estructural de membrana que se expresa de forma ubicua (Selkoe y cols. 1988) y se sintetiza en el retículo endoplásmico, desde donde viaja a la membrana plasmática vía aparato de Golgi o vesículas secretoras. Ya sea en éstas o en la propia membrana, algunas moléculas sufren un corte proteolítico en el aminoácido 16 del dominio A β (que abarca del aminoácido 597 al 639 de la isoforma de 695), que da lugar a la secreción de un fragmento largo de APP soluble (α -sAPP) y el péptido p3; en este proceso interviene la α -secretasa y se conoce como procesamiento no amiloidogénico, puesto que evita la formación del péptido A β . Sin embargo, el APP de la membrana plasmática puede ser reinternalizado a la célula mediante vesículas recubiertas de clatrina y, a través de la vía endosoma-lisosoma, o bien en el propio retículo, dar lugar al péptido A β , mediante la acción conjunta de las β y las γ -secretasas (Rocchi y cols. 2003). La Figura 2 ilustra ambos procesamientos.

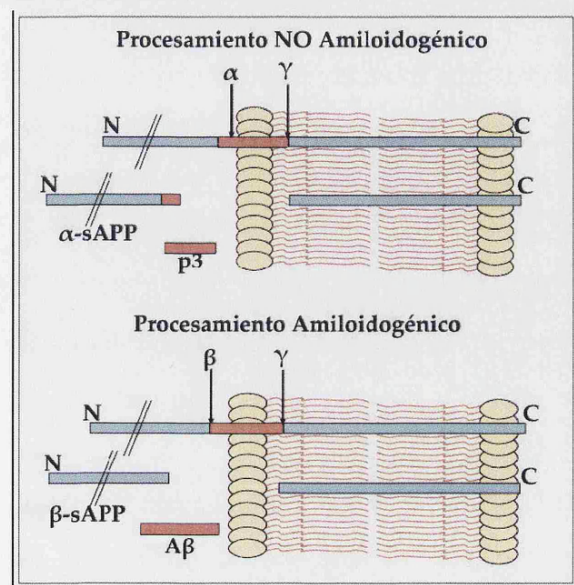


Figura 2: Procesamiento amiloidogénico y no amiloidogénico del APP. Se indican los cortes de las distintas secretasas en la proteólisis del APP.

Las mutaciones patogénicas del APP están situadas en la secuencia del péptido A β (ó flanqueando ésta) (Haass y Selkoe 2007), o en los sitios de corte de las secretasas, alterando el procesamiento del APP de tal forma que hay una sobre-producción del péptido A β o un desequilibrio entre las formas largas de 42 y 43 aminoácidos (A β ₄₂, A β ₄₃), más amiloidogénicas y la de 40 aminoácidos (A β ₄₀),

menos amiloidogénica (Chapman y cols. 2001; Hardy y Orr 2006). La presencia por triplicado de este gen es la responsable de la frecuencia con la que aparece la EA en los individuos con trisomía 21 (Síndrome de Down).

Presenilinas

Los genes *PSEN1* y *PSEN2* se encuentran en los cromosomas 14 y 1, localizaciones 14q24.3 y 1q31-q42, respectivamente. Un trabajo anterior al hallazgo de la primera mutación en el gen *APP* ya había señalado el cromosoma 14 como portador de *loci* ligados a la EA familiar (Schellenberg y cols. 1992; St George-Hyslop y cols. 1992). En 1995 se aisló el gen de la *PSEN1*, denominado así por su descubrimiento como causante de EA presenil, y se le identificó como el principal portador de mutaciones responsables de EA monogénicas (Sherrington y cols. 1995).

Poco después del hallazgo del gen *PSEN1* se identificó el gen *PSEN2* como portador de mutaciones responsables de algunos casos de EA familiar, y se denominó así por su alto grado de homología con el gen *PSEN1* (Levy-Lahad y cols. 1995). Las mutaciones descritas en este gen son mucho menos abundantes que las de *PSEN1*, y la mayor parte de ellas se encuentra en los dominios transmembrana conservados en ambas proteínas. La mayor parte de las mutaciones causantes de EA familiar se encuentran en el gen *PSEN1* y dan lugar a las formas más agresivas de la enfermedad, en cuanto a un inicio muy precoz de los síntomas y un progreso más rápido (Cruts y Van Broeckhoven 1998).

Las proteínas Psen1 y Psen2 se localizan mayoritariamente en membranas asociadas al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi y parece que ambas tienen una organización topográfica semejante, con 8 dominios transmembrana (Mattson y cols. 1998). Hasta hace poco no se conocía su relación con la EA, pero actualmente se sabe que la actividad γ -secretasa es un complejo formado por Psen, nicastrina (Ncstn), alfa proteína 1 (Aph-1) y potenciador 2 de Psen1 (Pen-2), siendo la Psen el dominio catalítico del complejo (Dominguez y cols. 2004; Thinakaran y Parent 2004; Gandy 2005).

Las mutaciones asociadas a EA en estos dos genes tienen como consecuencia una pérdida de la función en el complejo γ -secretasa que conduce a un aumento en la relación $A\beta_{42-43}/A\beta_{40}$ (De Strooper 2007; Wolfe 2007).

Por otra parte, se sabe que las Psen son necesarias para la regulación de la diferenciación neuronal, espermatogénesis, oogénesis y miogénesis, posiblemente por su implicación en la vía de señalización de Notch, que para llevar a cabo su función biológica requiere un corte proteolítico en

su extremo C terminal por una actividad de tipo γ -secretasa (Nunan y Small 2000; Brunkan y Goate 2005).

1.2.2. Enfermedad de Alzheimer Esporádica

La forma esporádica o compleja no sigue ningún patrón de herencia mendeliano lo que indicaría una enfermedad de naturaleza multifactorial, en cuya patogénesis influyen tanto factores de riesgo genéticos como factores ambientales y exógenos, en número y combinación aún no conocido. La EA esporádica se considera, con mucho, la más frecuente, representando el 95-99% de todos los casos (Corder y cols. 1993), siendo la edad, en este caso, el mayor factor de riesgo. Se suele presentar en etapas seniles.

Factores de riesgo genéticos

En los factores de riesgo genéticos se incluye la predisposición genética (polimorfismos en el gen de la Apolipoproteína E (*APOE*) y otros genes aún no confirmados universalmente). Se sabe que la EA es más frecuente en los sujetos portadores del alelo $\epsilon 4$ de la ApoE (cromosoma 19), especialmente en los casos homocigóticos para dicho alelo, por lo que tener un familiar de primer grado afectado o portar el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE* constituye un factor de riesgo para la EA (Strittmatter y cols. 1993a; Bertram y Tanzi 2005). Por el contrario, se ha postulado un efecto opuesto para el alelo $\epsilon 2$, que tendría por tanto un papel protector. Respecto a otros factores de riesgo genéticos, se han desarrollado muchos estudios de asociación (caso - control) de polimorfismos en varios genes candidatos relacionados con la patogénesis de la EA, aunque ninguno de ellos confirmado universalmente. De entre los numerosos factores genéticos de riesgo descritos, en algunos casos se pueden observar datos contradictorios entre distintas poblaciones, probablemente debido a la interacción con factores ambientales que pueden variar en los distintos grupos poblacionales estudiados.

Apolipoproteína E (ApoE)

La ApoE es una apolipoproteína codificada por el cromosoma 19, localización 19q13.2, que tiene como principal función transportar lípidos y colesterol en el cuerpo humano (Bell y Zlokovic 2009). En 1993, como resultado de una búsqueda en familias para las que se había visto ligamiento de EA senil con el cromosoma 19 (Pericak-Vance y cols. 1991), se identificó al gen *APOE* como responsable de este ligamiento (Corder y cols. 1993).

El ApoE presenta en humanos tres isoformas comunes, ApoE2, ApoE3 y ApoE4 (alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, respectivamente) distribuidas de forma que la isoforma 3 es la mayoritaria y la 2 y la 4 se consideran variantes (Figura 3) (Saunders 2001; Bell y Zlokovic 2009).

<i>APOE</i> genotype	Control	AD
$\epsilon 2/\epsilon 2$	<1%	<1%
$\epsilon 2/\epsilon 3$	15%	5%
$\epsilon 3/\epsilon 3$	58%	33%
$\epsilon 2/\epsilon 4$	2%	3%
$\epsilon 3/\epsilon 4$	22%	42%
$\epsilon 4/\epsilon 4$	2%	16%
<i>APOE</i> alleles		
$\epsilon 2$	0.09	0.04
$\epsilon 3$	0.77	0.56
$\epsilon 4$	0.14	0.39

Figura 3: Frecuencias de alelos y genotipos ApoE en controles y pacientes con EA en la población europea (Rebeck y Hyman 1999).

Se ha encontrado una fuerte asociación del alelo $\epsilon 4$ de este gen con la enfermedad, si bien desde su descubrimiento se ha hecho evidente que la presencia de ApoE4 no es ni necesaria ni suficiente

para el desarrollo de la enfermedad, por lo que es considerado un factor de riesgo genético para el desarrollo de la EA. Se comprobó que este alelo estaba asociado con riesgo en individuos portadores que no tenían antecedentes familiares de demencia, y que se asociaba a casos tanto precoces como tardíos, disminuyendo la edad de aparición de los síntomas de forma dependiente de la carga alélica de ApoE4 (Corder y cols. 1993). En torno a la edad de 85 años, los individuos homocigotos para el alelo ApoE4 tienen una probabilidad de entre 50 y 90% de desarrollar la EA y los portadores en heterocigosis un 45%, frente al 20% que tiene la población general (Grossman y cols. 2006).

Además del alelo $\epsilon 4$, se han descrito distintos polimorfismos de riesgo para la enfermedad a lo largo de la región promotora de este gen, proporcionando las primeras indicaciones de que cambios en los niveles de expresión de determinados genes también pueden influir en los mecanismos patogénicos de la enfermedad (Artiga y cols. 1998a; Artiga y cols. 1998b; Bullido y cols. 1998).

En cuanto a la función que ApoE desempeña en el cerebro, los astrocitos y la microglía son sus principales productores, participando de una forma muy activa en el mecanismo de regeneración

INTRODUCCIÓN

neuronal. Estas células liberan ApoE al medio para poder captar los lípidos y el colesterol de las membranas neuronales dañadas, por ejemplo, por trauma, para su regeneración (Poirier 1994).

Con respecto al aclaramiento de A β vascular, se ha observado que ApoE es una proteína chaperona del péptido A β , y se la ha asociado con el transporte alterado de este péptido a través de la BHE. Particularmente, los complejos ApoE2-A β y ApoE3-A β son transportados a través de la BHE más rápidamente que los complejos ApoE4-A β . Se ha observado que el A β libre puede ser transportado rápidamente desde el cerebro hacia la sangre principalmente vía LRP1, y los complejos A β -ApoE son transportados por los receptores de VLDL a una velocidad más lenta, causando su retención en el cerebro (Bell y Zlokovic 2009).

También se ha observado que pericitos con genotipos ApoE2 o ApoE3, comparados con los pericitos con el alelo ApoE4, tienen mayor resistencia a los efectos tóxicos de A β ₄₀ que portan la mutación E22Q, observada en pacientes con hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo holandés (Bell y Zlokovic 2009). La distribución del amiloide cerebrovascular en pacientes con EA varía con el genotipo ApoE y específicamente el incremento de la carga del alelo ApoE4 ha sido asociado con incremento de angiopatía amiloide cerebral (Bell y Zlokovic 2009).

En cualquier caso, el mecanismo por el que ApoE está implicado en la EA no está claro, encontrándose diversas revisiones sobre sus posibles funciones, aunque aún no está claramente determinado cuál o cuáles de ellas son relevantes para el desarrollo de la enfermedad (Mahley y cols. 1996; Saunders 2000). Independientemente del mecanismo, todos los indicios apuntan a que ApoE no es causante de EA, sino que su principal acción sería modificar el curso de la misma, dependiendo de la forma alélica y de la carga (Meyer y cols. 1998).

Otros genes

Respecto a otros factores genéticos de riesgo, se han desarrollado numerosos estudios de asociación de polimorfismos en genes candidatos relacionados con la patogénesis de la EA, basándose la mayor parte de ellos en diversas hipótesis patogénicas. Así, se han analizado genes de otras proteasas que podrían participar en la hidrólisis de APP, genes relacionados con inflamación, apoptosis, neurotransmisores, etc.

Se puede encontrar un listado de estos genes candidatos clasificados según su función en la página web <http://www.alzgene.org> (Bertram y cols. 2007).

Hasta la fecha, el gen *APOE* era el único factor de riesgo genético para la EA esporádica replicado de forma consistente, aunque recientemente se han descubierto varios polimorfismos con una fuerte

asociación con la EA en dos genes diferentes, el gen *CLU* (clusterina) y el gen *PICALM* (del inglés; phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein).

El gen *CLU*, es un gen que codifica otra apolipoproteína principal en el cerebro, la apolipoproteína J, lo que sugiere que los genes de susceptibilidad no están distribuidos al azar. La forma predominante de la clusterina es una glicoproteína secretada heterodimérica de 75-80 KDa. Este gen que se expresa en todos los tejidos en mamíferos (Harold y cols. 2009), abarca 16 Kb en el cromosoma 8, localización 8p21-p12, y codifica un ARN mensajero de aproximadamente 2 Kb que se traducen en una cadena polipeptídica primaria de 449 aminoácidos.

Se ha observado que en pacientes con EA, la expresión de *CLU* está incrementada en áreas corticales afectadas del cerebro y está presente en las placas de amiloide y en LCR (Suzuki y cols. 2002; Harold y cols. 2009).

La clusterina/ApoJ es una molécula multifuncional que interacciona con formas solubles de A β en modelos animales de EA, y une A β soluble de manera específica y reversible, formando complejos que cruzan la BHE (Ghisso y cols. 1993; Harold y cols. 2009).

Además parece regular la toxicidad de A β y su conversión a formas insolubles. Por lo tanto, tanto el ApoE como la clusterina/ApoJ cooperan en la supresión de la deposición de A β , y pueden modificar críticamente el transporte de A β a través de la BHE del cerebro a la sangre, lo que podría sugerir un papel de la clusterina/ApoJ en la vía amiloidogénica. Mientras que los niveles de la proteína ApoE son inversamente proporcionales a los niveles de la carga del alelo ApoE4, los niveles de clusterina/ApoJ están incrementados en proporción a los niveles de la carga del alelo ApoE4, sugiriendo una inducción de clusterina/ApoJ en los individuos con bajos niveles de ApoE (homocigotos para el alelo ApoE4) (Harold y cols. 2009).

El gen *PICALM* está localizado en el cromosoma 11 y se expresa en todos los tipos de tejidos y de forma más pronunciada en neuronas (Harold y cols. 2009). La proteína está involucrada en la endocitosis mediada por clatrina, un paso esencial en el tráfico intracelular de proteínas y lípidos tales como nutrientes, factores de crecimiento y neurotransmisores (Harold y cols. 2009).

Se sugiere que cambios directos en la función del *PICALM* ocasionan perturbaciones en las sinapsis, posiblemente a través del ciclado de vesículas sinápticas, incrementando el riesgo para la EA. Alternativamente, el gen *PICALM* podría influir en el riesgo para la EA a través del procesamiento de APP vía endocítica, resultando en cambios en los niveles de A β (Harold y cols. 2009).

También se han descrito polimorfismos en genes implicados en señalización adrenérgica que están relacionados con la EA esporádica, de manera que el riesgo se correlacionaba con la capacidad de

respuesta de las células a la estimulación adrenérgica, sugiriendo que esta vía de señalización podría estar implicada en la patogénesis de la EA esporádica (Bullido y cols. 2004).

Factores de riesgo exógenos o ambientales

Como principales factores de riesgo ambientales para la EA descritos en la bibliografía, se encuentran la edad avanzada (puesto que el envejecimiento es el principal factor de riesgo para la EA) (Amaducci y Tesco 1994), el sexo [las mujeres parecen tener mayor riesgo de padecer la EA (Fischer y Berner 1991; Fratiglioni y cols. 1997; Letenneur y cols. 1999), aunque existen estudios contradictorios], haber sufrido traumatismo craneal (Graves y cols. 1990; Rocca y cols. 1990), nivel de educación bajo (nivel cultural) (Stern y cols. 1994), reserva cognitiva limitada (cociente intelectual, cultura, estudios académicos y actividades intelectuales) (Bermejo-Pareja y cols. 2008), hipertensión arterial (Anson y Paran 2005; Elias y cols. 2004), ciertas infecciones (Itzhaki y cols. 1997), diabetes (Kopf y Frölich 2009), dietas ricas en grasas (Scarmeas y cols. 2009), abuso de alcohol (Stern y cols. 1994), exposición a toxinas (Stern y cols. 1994) y tabaquismo (Ott y cols. 1998; Reitz y cols. 2007) favorecen también el desarrollo de la EA en las personas genéticamente predispuestas.

Además de estos factores, cada vez es más evidente la posible implicación de agentes infecciosos en la etiología de distintas enfermedades de la edad adulta, entre las que se incluye la EA esporádica. Por lo tanto, actualmente se considera la posibilidad de que haya una contribución infecciosa también para el desarrollo de la demencia (Dobson y cols. 2003; Itzhaki y cols. 2004). En 1982 se sugirió al HSV-1 como posibles virus que podrían estar relacionados con la EA, debido a que en la encefalitis por HSV-1, las regiones del cerebro que antes se afectan, y de forma más severa, son las mismas que en EA y muestran los cambios patológicos más tempranos y más severos (Itzhaki 2004).

En conclusión, ninguno de los factores de riesgo (genéticos y ambientales) por separado son causantes directos de la enfermedad, siendo ambos necesarios pero no suficientes para su desarrollo, necesitando además del factor envejecimiento. Muchos de esos factores son controlables mediante la dieta, el mantenimiento de un peso corporal adecuado y algunos medicamentos, lo que incrementa su importancia epidemiológica. Lo mismo puede decirse de la llamada “reserva cognitiva”, que se define como un modelo dinámico de activación cerebral que utilizan los sujetos normales y que implica una capacidad para la activación progresiva de redes neuronales en respuesta al aumento en las demandas cognitivas (Stern 2006). Los sujetos con mayor capacidad

cognitiva natural o adquirida (cociente intelectual, cultura, estudios académicos, participación en actividades intelectuales y de esparcimiento como juegos de mesa, baile...) presentan la enfermedad más tarde que los sujetos con menor reserva cognitiva, a igual cantidad de lesiones histopatológicas cerebrales típicas de EA presentes en sus cerebros. La idea que hay detrás de la reserva cognitiva es que el cerebro intenta compensar activamente los daños histopatológicos. Las personas con mayor reserva cognitiva pueden compensar la pérdida neuronal mediante la utilización de redes cerebrales alternativas o más eficientes, pudiendo funcionar con más normalidad de la que cabría esperar por su histopatología (Bermejo-Pareja y cols. 2008).

2. ALTERACIONES PATOGÉNICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En los últimos años, se ha acumulado gran cantidad de información relativa a los mecanismos moleculares implicados en la patogenia de la EA, derivada fundamentalmente de la experimentación con animales modificados genéticamente y cultivos celulares como modelos para el estudio de la EA. Como era de esperar desde que se observó la presencia de A β en neuronas degeneradas de pacientes con EA, las alteraciones en la estructura y/o el procesamiento de APP juegan un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad. Los cambios bioquímicos asociados de forma general con el envejecimiento, como niveles elevados de radicales libres (Varadarajan y cols. 2000), alteraciones en el metabolismo energético (Gibson y cols. 1998), oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos (Butterfield y Stadtman 1997) y alteraciones en la homeostasis iónica (Mattson 2000) aparecen acentuados en el cerebro de pacientes de EA. Otros mecanismos destacados implican cambios en la organización del citoesqueleto como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína tau, una respuesta inflamatoria crónica y una posible desregulación de los mecanismos que controlan el ciclo celular (McGeer y McGeer 1995; De las Cuevas y cols. 2005; Nagy 2007; Lopes y cols. 2009).

2.1. NEUROPATOLOGÍA

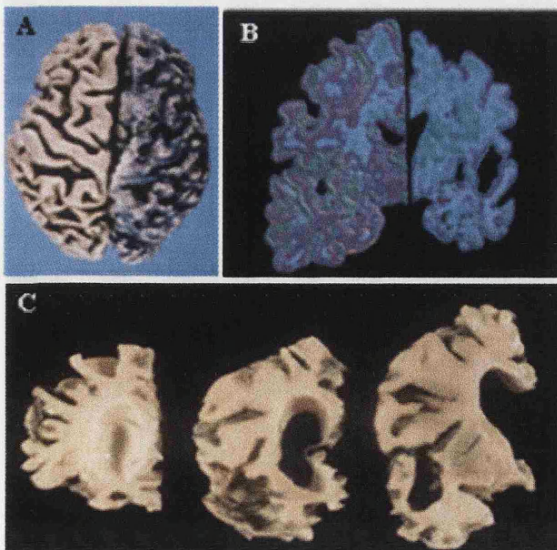
A nivel anatómico se producen lesiones macroscópicas que incluyen atrofia cerebral, degeneración del hipocampo (relacionado con pérdida de memoria), lóbulos frontales, lóbulos parietales,

ventrículos laterales y locus coeruleus (relacionado con depresión y alteraciones del sueño) y lesiones microscópicas como aparición de placas seniles, ovillos neurofibrilares, inflamación, atrofia, alteraciones sinápticas (pérdida de conexiones sinápticas, defectos y pérdida de espinas sinápticas) y pérdida selectiva de neuronas (Selkoe 2000a; Cummings 2004) que afecta fundamentalmente a las grandes neuronas de la corteza (Mann y cols. 1988), hipocampo, amígdala, corteza entorrinal y algunos núcleos subcorticales que emiten proyecciones hacia el hipocampo y la neocorteza.

Los pacientes con EA también pueden padecer otras lesiones no específicas, como degeneración granulovacuolar, cuerpos de Hirano y cuerpos de Lewy (DeKosky 2002; DeKosky y López 2003).

Dentro de las lesiones macroscópicas, las alteraciones están tipificadas por una atrofia generalmente simétrica y difusa de los giros cerebrales (Figura 4), que se evidencia en la disminución del espesor de las circunvoluciones, aumento en la profundidad de los surcos, dilatación del sistema ventricular y disminución del peso y volumen cerebral (existe una correlación negativa entre el peso del encéfalo y el tiempo de evolución de la enfermedad). La atrofia levemente asimétrica es menos frecuente. La atrofia afecta a los lóbulos temporales (más frecuentemente), frontales, parietales u occipitales. El patrón de atrofia más común es el difuso, seguido por una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas, y en menor proporción puede haber un compromiso parieto-occipital.

Figura 4: A: Visión superior del cerebro de un paciente afecto de EA. Atrofia cerebral difusa que caracteriza a la EA,



el ensanchamiento de las fisuras y el adelgazamiento de las circunvoluciones. **B:** Hipofunción de las áreas de asociación. La confirmación de la enfermedad en un paciente que desarrolla manifestaciones clínicas típicas de EA se consigue con la observación por resonancia magnética, o tomografía computarizada de zonas de atrofia cerebral progresiva que comienza en las regiones entorrinal e hipocámpica o con el hallazgo de un hipofunción de las áreas de asociación temporoparietales posteriores (SPECT, PET). **C:** Cortes coronales de un hemisferio provenientes de un paciente afecto de Alzheimer. Atrofia cortical así como subcortical, puesta de manifiesto en la dilatación de las cavidades ventriculares (Guimerà y cols. 2002).

Secciones a través de los hemisferios cerebrales revelan un adelgazamiento de la lámina cortical y dilatación simétrica del sistema ventricular (hidrocéfalo «ex-vacuo»). Los ganglios basales,

diencéfalo, mesencéfalo y el tronco cerebral no muestran anormalidades notables. El núcleo basal de Meynert (área innominata) revela una predilección por la pérdida neuronal, formación de ovillos (degeneración neurofibrilar) y ausencia de placas seniles características. El hipocampo, el subiculum, la amígdala y las áreas de asociación neocorticales muestran las alteraciones más graves. El hipocampo y la corteza del lóbulo temporal están casi siempre afectados y muestran el patrón topográfico del progreso de la enfermedad que fue utilizado para definir las etapas histopatológicas tempranas y tardías de la EA (Guimerà y cols. 2002).

De éste modo, existe una clara progresión de la EA asociada con lesiones en el córtex cerebral, encontrándose un patrón de afectación regional que determina las distintas etapas histopatológicas tempranas y tardías de la EA (Braak y Braak 1996), las cuales se han dividido en 6 estadios durante el curso de la EA según la presencia y localización de neuronas con degeneración neurofibrilar existiendo una correlación entre el número de ovillos neurofibrilares y el grado de demencia (Perry y cols. 2006). Dentro del córtex, el proceso neurodegenerativo de la EA afecta primero a una extensa pero única área vulnerable, la región transentorrinal perialocortical, dentro del lóbulo temporal anteromedial. También están involucradas áreas adicionales del córtex incluso más extensas. Las células de proyección específica de la capa superficial de la región transentorrinal perialocortical, que se localizan en las profundidades del surco rinal, son las primeras neuronas corticales que manifiestan los cambios (estadio I clínicamente silencioso).

Los casos de estadios mesocorticales I y II muestran numerosos ovillos neurofibrilares y hilos del neuropilo en la región transentorrinal con lesiones más severas, y algunos adicionales en la capa celular superficial de la región entorrinal.

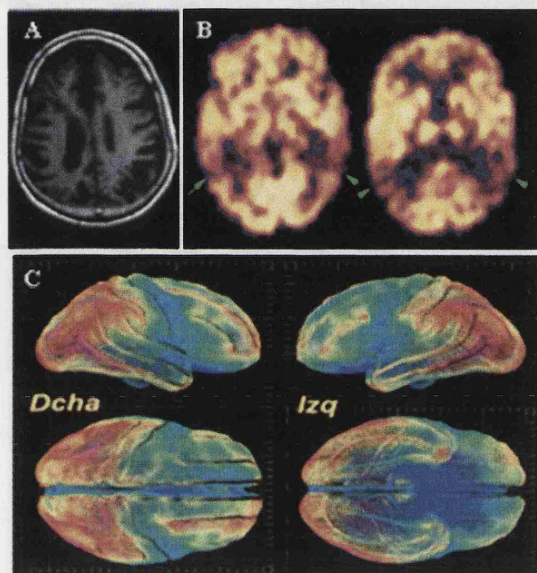
En los casos de estadios límbicos III o IV, el daño neuronal impide la transmisión de información sensorial al neocórtex profrontal, desde la neocorteza hasta el hipocampo y viceversa. La capa profunda entorrinal muestra afección adicional. Desde el proneocórtex temporal el proceso de la enfermedad invade gradualmente el neocórtex maduro adyacente. El proceso de destrucción se difunde desde la región entorrinal hacia la amígdala, el hipocampo y especialmente hacia las áreas de asociación de la neocorteza.

En los casos de estadios neocorticales V o VI, la afectación no sólo se produce en regiones alo corticales y amígdala, sino también en áreas de asociación sensorial del neocórtex prefrontal, llevando a la alteración de la memoria y de las funciones cognitivas, e incluso funciones del lenguaje, motoras, visuales, etc. Estos estadios corresponden a la EA completamente desarrollada (Perry y cols. 2006).

A día de hoy existen diversas pruebas clínicas que permiten ver los cambios a nivel macroscópico que se producen en el cerebro de los enfermos de Alzheimer, entre ellos la resonancia magnética,

cuyo uso se encuentra generalizado a nivel clínico y aporta una serie de datos sobre zonas de atrofia cerebral, tal y como se puede apreciar en las fotos de la Figura 5.

Figura 5: A: Atrofia cortical difusa con surcos prominentes. La resonancia magnética (RM) y la tomografía computarizada permiten diagnosticar la EA con una exactitud del 85 al 95%. En las RM se suelen observar atroñas en



la región mesial temporal y lesiones difusas subcorticales. Sin embargo, en ocasiones no se observan hallazgos anormales, en cuyo caso, son necesarios estudios funcionales con ^{18}F -fluroglucosa por tomografía de emisión de positrones. **B:** Áreas de hipometabolismo a la glucosa ^{18}F . Los estudios funcionales, utilizando la tomografía de emisión de positrones y glucosa marcada con F^{18} permiten estudiar el metabolismo de diferentes áreas del cerebro. En la EA suelen observarse áreas de hipometabolismo en las zonas posteriores de los lóbulos temporal y parietal. **C:** Topografía de la EA. Representación anatómica de la afectación de la corteza cerebral en una media de 26 pacientes. La afectación de las áreas de asociación temporoparietal y frontal (en rojo) es 10 veces mayor que en la corteza sensorimotora (en azul).

2.2. β -AMILOIDE

El péptido $\text{A}\beta$ es un fragmento de 38-43 aminoácidos que deriva del procesamiento proteolítico de la proteína APP. Éste fragmento está situado entre el único dominio transmembrana y la larga región extracelular del APP (Glennner y Wong 1984; Masters y cols. 1985; Bell y Zlokovic 2009).

En contra de lo que se postuló inicialmente, se sabe ahora que $\text{A}\beta$ es un producto normal del metabolismo de APP, que es producido por prácticamente todo tipo de células de mamíferos y que circula por los fluidos extracelulares. La mayoría de $\text{A}\beta$ generado intracelularmente es secretado, y los niveles de $\text{A}\beta$ en el LCR son mayores que los plasmáticos (Scheuner y cols. 1996), lo que sugiere que $\text{A}\beta$ puede atravesar la BHE y acumularse en el cerebro (Poduslo y cols. 1999).

El péptido $\text{A}\beta$ es liberado a partir del APP presente en la membrana plasmática o en vesículas intracelulares como endosomas, por cortes secuenciales producidos por la β -secretasa (BACE del inglés β -site APP-cleaving enzyme), y por la γ -secretasa, una proteasa intramembrana que contiene a la presenilina como sitio catalítico formando un complejo con otras 3 proteínas de membrana, como nicastrina, Aph-1 y Pen-2 (Selkoe 2004).

El APP puede ser procesado por diferentes vías por medio de diferentes grupos de enzimas, una vía lleva a la formación de placas, la llamada vía amiloidogénica, mientras que la otra no lleva a la formación de placas, por ello llamada vía no amiloidogénica (Figura 6).

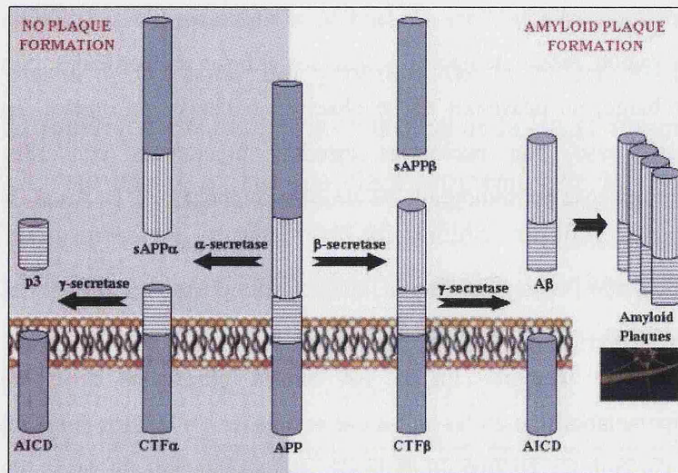


Figura 6: Procesamiento enzimático del APP: La α -secretasa y γ -secretasa producen el fragmento p3 no formador de placas, mientras que la β -secretasa y γ -secretasa producen el fragmento A β formador de placas. En la figura se indican las diferentes regiones de la proteína APP.

Aproximadamente el 90% del APP entra en la vía no amiloidogénica, y el 10% restante lo hace en la vía amiloidogénica,

pero esta relación puede variar debido a mutaciones, factores ambientales, e incluso por la edad del individuo, ya que se ha descrito que la actividad β -secretasa se incrementa con la edad (Fukumoto y cols. 2004; Nistor y cols. 2007).

En la vía no amiloidogénica, no formadora de placas, el APP sufre primero cortes constitutivos regulados por ciertas metaloproteasas llamadas α -secretasas, principalmente se creen que son ADAM 10 y ADAM 17, para producir un fragmento N-terminal soluble (sAPP α) y un fragmento C-terminal (CTF α). El corte producido por la α -secretasa se produce entre los residuos 16 y 17 de la región A β del APP. El fragmento sAPP α puede estar involucrado en la mejora o aumento de la sinaptogénesis, crecimiento de neuritas y supervivencia neuronal, por lo que se considera un neuroprotector. El fragmento CTF α es retenido en la membrana, donde es procesado por la γ -secretasa (compuesta entre otras enzimas por la presenilina) para generar un pequeño fragmento N-terminal soluble e hidrofóbico (p3, cuya función normal y papel en la EA, si la tiene, es desconocida) y un fragmento C-terminal unido a la membrana (AICD, o dominio APP intracelular), el cual puede estar involucrado en la señalización nuclear vía regulación transcripcional y en el transporte axonal a través de su habilidad para asociarse con una gran cantidad de diferentes proteínas.

En la vía amiloidogénica, formadora de placas, el APP es cortado primero por una proteasa transmembrana, la β -secretasa, produciendo un fragmento N-terminal soluble (sAPP β) y un fragmento C-terminal unido a la membrana (CTF β). Este corte se produce más cerca del extremo N-terminal del APP que con la α -secretasa, produciendo un CTF β más largo que el CTF α . El fragmento CTF β es entonces procesado por la γ -secretasa (como ocurre en la vía no

INTRODUCCIÓN

amiloidogénica), produciendo un fragmento C-terminal unido a la membrana (AICD), el mismo que en la otra vía, y un fragmento N-terminal soluble ($A\beta$), que es más largo que el p3, y que una vez formado es secretado fuera de la célula (Ulery y Strickland 2000).

El sitio de corte de las γ -secretasas es variable e impredecible, y se puede producir tras los aminoácidos 38, 40 y 42. La posición del corte es de especial relevancia en el desarrollo de la EA, por la diferente tendencia a la agregación de los distintos péptidos generados. Por lo tanto, la producción de las especies tóxicas de oligómeros de $A\beta$ y su habilidad para producir daño neuronal depende de la precisión en los cortes proteolíticos intramembrana. De hecho, el péptido $A\beta_{42}$ es más hidrofóbico que el $A\beta_{40}$, forma agregados y oligómeros con mayor facilidad, y tiende a formar oligómeros estables triméricos y tetaméricos, mientras que el $A\beta_{40}$ no tiene estas propiedades, aunque éste último constituye el 90% del total de $A\beta$ generado. Además, algunas especies de oligómeros de $A\beta$ son lo suficientemente pequeños y solubles como para difundir a través del parénquima cerebral hacia la hendidura sináptica y afectar tanto la estructura como la función sináptica, y en último término la supervivencia neuronal (Haass y Selkoe 2007). Los oligómeros de $A\beta$ también pueden polimerizar en fibrillas insolubles amiloides que se agregan en placas esféricas, resultando en la disfunción de axones y dendritas adyacentes (Selkoe 2004).

Varias mutaciones del APP se concentran en las regiones de corte de las secretasas, favoreciendo la generación de péptido $A\beta$ y su agregación posterior (Figura 7).

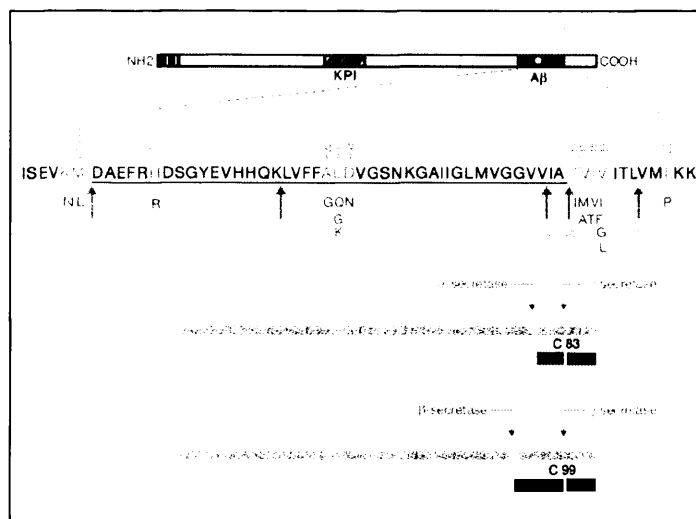


Figura 7: Diagrama esquemático del APP y sus principales derivados proteolíticos. Mutaciones en APP asociadas a la EA. Los cambios de los aminoácidos en la cadena polipeptídica se indican con letras bajo la secuencia normal. Se indica en forma numérica su posición en la cadena. La secuencia correspondiente al $A\beta_{42}$ está subrayada (Selkoe 2004).

Todas las mutaciones en APP que han sido identificadas como causantes de EA familiar, se producen en la región $A\beta$ o flanqueando ésta. De acuerdo con esto, las mutaciones que flanquean la región $A\beta$ incrementan la producción de la isoforma $A\beta_{42}$, altamente amiloidogénica, mientras que las mutaciones dentro de la región $A\beta$, aumentan la oligomerización del péptido (Haass y Selkoe 2007).

INTRODUCCIÓN

La relación $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ puede aumentar por mutaciones en los genes asociados a la EA familiar, *APP*, *PSEN1* Y *PSEN2*, todos ellos implicados en el procesamiento de $A\beta$.

El aumento en la producción del péptido $A\beta_{42}$ resulta en un incremento en los niveles absolutos de $A\beta_{42}$, o en un incremento en la relación $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, lo que sería suficiente para provocar el fenotipo de EA (Haass y Selkoe 2007). Este incremento relativo de $A\beta_{42}$ aumenta la formación de oligómeros. En paralelo, $A\beta_{42}$ forma depósitos visibles en el parénquima cerebral, primero como placas difusas (no fibrilares).

También se produce la pérdida de espinas sinápticas y la distrofia neurítica. Estos eventos resultan en estrés oxidativo, alteraciones iónicas y de homeostasis. La alteración de las actividades quinasa y fosfatasa en el citoplasma neuronal inducen la formación de ovillos neurofibrilares, y contribuyen a efectos adicionales, incluyendo el transporte axonal. La cascada culmina en una gran disfunción neuronal y sináptica y en la muerte celular, llevando a una demencia progresiva asociada con la patología de $A\beta$ y tau (Haass y Selkoe 2007).

Esta tendencia a la agregación de $A\beta$ que lleva gradualmente a comprometer la función sináptica y neuronal y la activación glial, es conocida como “hipótesis de la cascada amiloide”. Ésta hipótesis propone que la acumulación progresiva de $A\beta$ a lo largo de la vida y su agregación y deposición, inicia una compleja cascada multicelular que incluye activación microglial y astrocítica, formación de neuritas distróficas, daños patológicos en el citoesqueleto producidos por modificaciones de la proteína tau, pérdida de las funciones sinápticas y neurotransmisoras, y finalmente la muerte neuronal por apoptosis (Selkoe 2003; Haass y Selkoe 2007). Esta hipótesis se sustenta en tres observaciones;

- 1) El efecto tóxico del $A\beta$ basado en experimentos *in vitro*, donde la adición de $A\beta$ fibrilar se vio que era neurotóxica, bien actuando sobre la función mitocondrial (Kaneko y cols. 1995), la homeostasis del Ca^{2+} (Clarke y cols. 1998) o a través de la interacción con APP (Lorenzo y cols. 2000).
- 2) Las mutaciones encontradas en la forma familiar de la enfermedad producen, bien directa o indirectamente, un aumento del $A\beta$ y por tanto mayor generación de placas (Goate y cols. 1991; Rogaev y cols. 1995; Sherrington y cols. 1995).
- 3) La sobreexpresión de APP a lo largo de la vida aumenta la deposición de $A\beta$ como confirma el hecho de que pacientes con la trisomía del 21, cromosoma donde se localiza APP, desarrollan placas de amiloide a edades tempranas (Hardy y Allsop 1991) y el descubrimiento de un nuevo tipo de EA familiar como consecuencia de la duplicación del locus de APP (Rovelet-Lecrux y cols. 2006).

La Figura 8 recoge esquemáticamente la secuencia de acontecimientos que eventualmente originarían la EA según Dennis Selkoe.

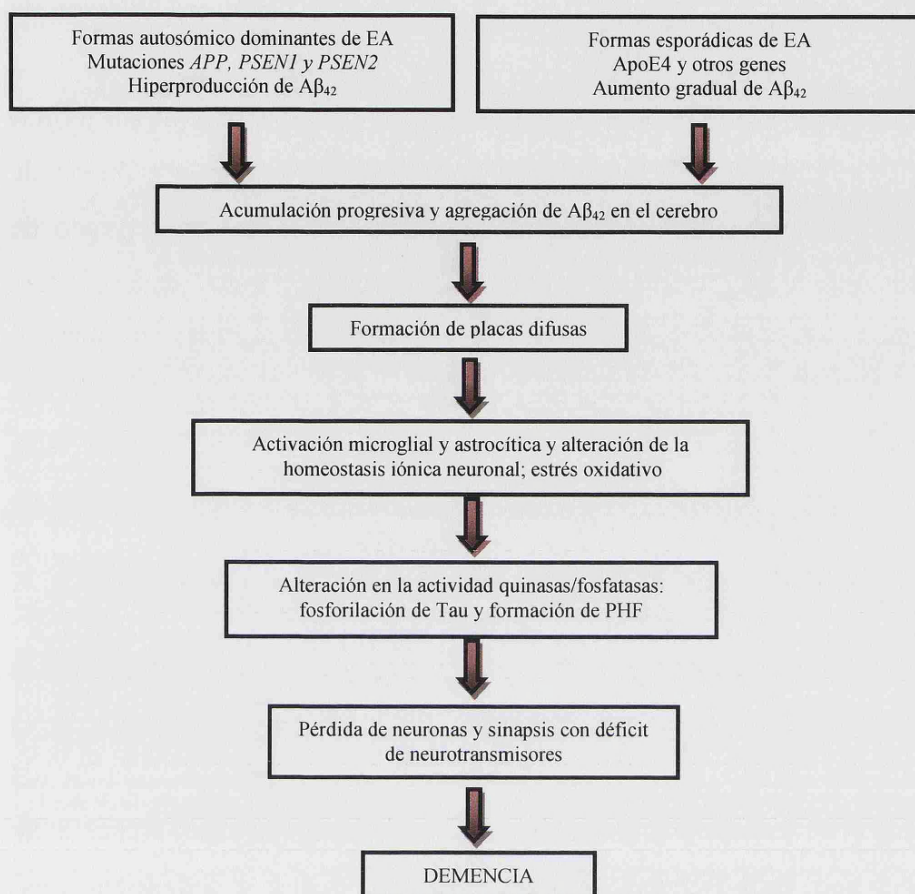


Figura 8: Esquema sobre la hipótesis de la cascada de Aβ (Adaptado de Haass and Selkoe 2007).

Los efectos de la acumulación de Aβ en los fluidos intersticiales del cerebro y, probablemente, intracelularmente (Gouras y cols. 2000), incluyen una respuesta inflamatoria exacerbada (McGeer y McGeer 1995), un aumento en la generación de radicales libres (Keller y cols. 1998), mecanismos de oxidación de proteínas, lípidos y otras macromoléculas (Behl y cols. 1994), así como una mayor vulnerabilidad neuronal a la excitotoxicidad y apoptosis (Mattson 2000). Otra consecuencia de la acumulación de Aβ es una alteración de la homeostasis iónica (Mattson y cols. 1992). El aumento en la entrada de Ca^{2+} , desde el medio extracelular y su acumulación en la célula, parece jugar un papel importante en la neurodegeneración (Chittajallu y cols. 1998). Por otra parte, un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} puede contribuir a una mayor fosforilación de tau y desestabilización de los microtúbulos, ya que se ha descrito la participación de quinasas dependientes de Ca^{2+} /Calmodulina en la fosforilación de tau (Yoshimura y cols. 2003).

Aunque la cascada patológica del Aβ puede explicar el deterioro de las funciones cognitivas en la EA, aún quedan importantes cuestiones por resolver. Quizás la más significativa, es la que se refiere a la vulnerabilidad selectiva de las distintas poblaciones neuronales. Existen diferencias locales y

regionales en la acumulación crónica de A β ₄₂ (Selkoe 2002). En algunas zonas no se llegan a formar estructuras fibrilares como, por ejemplo, en el cerebelo, cuerpo estriado y tálamo, mientras que en otras zonas (hipocampo y corteza cerebral) tiene lugar la oligomerización y fibrilación de manera importante (Selkoe 2002).

Estas observaciones sugieren la existencia de factores pro y anti-agregantes de A β en las formas oligoméricas tóxicas. Algunos estudios cuestionan esta hipótesis y sugieren que la cantidad de depósitos de A β en cerebros de pacientes con EA, apenas guarda correlación con el grado de deterioro cognitivo o la cuantía de la pérdida neuronal o sináptica que estos experimentan (Arriagada y cols. 1992; Gómez-Isla y cols. 1997). Pero quizás, el principal argumento en contra de la hipótesis de la cascada amiloide es que, pese a todos los esfuerzos, aún no se han identificado con certeza cuales son las especies neurotóxicas de A β *in vivo*, ni el mecanismo por el cual éstas interfieren con el normal funcionamiento de las neuronas y sinapsis. Se piensa que la toxicidad de A β se debe fundamentalmente a su acumulación, más que al daño que causa su agregación formando placas (Selkoe 2003). A β puede presentarse de diversas formas: monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros que son los que forman las fibrillas presentes en las placas neuríticas y en la microvasculatura. Las teorías más recientes proponen que no es el A β fibrilar el responsable de la interrupción de la plasticidad sináptica y de la muerte neuronal, sino oligómeros solubles del péptido, es decir, la forma prefibrilar del A β (Malaplate-Armand y cols. 2006; Selkoe 2008; Shankar y cols. 2008). Sin embargo, las evidencias del papel de los oligómeros de A β soluble como causa de la pérdida sináptica y del subsiguiente síndrome de demencia en los pacientes, todavía no son del todo claras. Pese a que de momento solo tenemos un conocimiento parcial de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la EA y que en la hipótesis de la cascada amiloide está pendiente establecer de forma firme la relación causa-efecto entre el acúmulo de A β y la formación de ovillos neurofibrilares o de la pérdida de neuronas y sinapsis; esta hipótesis ha permitido la puesta en marcha de novedosas estrategias terapéuticas, encaminadas a disminuir la producción de A β actuando sobre las β y γ secretasas (Scorer 2001).

2.2.1. Placas neuríticas

Las placas neuríticas, una de las lesiones cerebrales descritas en el artículo original de Alois Alzheimer, son acúmulos microscópicos extracelulares de diámetro variable (entre 20 y 200 μ m) que se asocian al daño de axones y dendritas en ciertas áreas del cerebro como son el área de

asociación de la corteza, hipocampo y amígdala (McKhann y cols. 1984; Morris y cols. 1996). Estas placas se producen por el depósito y agregación de péptidos de A β de 40 a 43 aminoácidos

(Glenner y Wong 1984), siendo mayoritarias las formas A β_{40} y A β_{42} (Haass y cols. 1992) y que actúa como un núcleo para el reclutamiento de células, astrocitos y microglía y otras proteínas. Concretamente, la mayor parte del A β fibrilar presente en las placas neuríticas es el fragmento A β_{42} con sus residuos plegados en estructura β , que incluye una región hidrofóbica por la que pueden interaccionar con otras moléculas de A β y formar grandes agregados insolubles (Jarrett y cols. 1993), aunque también contiene A β_{40} (Iwatsubo y cols. 1994).

Las placas neuríticas se componen de un núcleo central de amiloide fibrilar, rodeado de neuritas distróficas de las neuronas circundantes (que degeneran en respuesta a la citotoxicidad causada por el A β y que contienen restos de lisosomas y mitocondrias), y de astrocitos reactivos y microglía activada (Terry y cols. 1964; Gonatas y cols. 1967; Akama y cols. 1998).

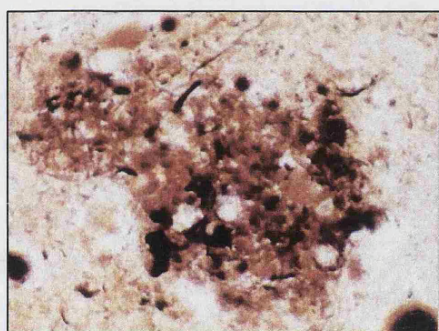


Figura 9: Placas neuríticas de amiloide. Los depósitos de amiloide aparecen ampliamente distribuidos en la materia gris cortical observándose gránulos difusos tioflavina positivos. En muchos casos, el A β se encuentra rodeando las arteriolas corticales y leptomeníngeas.

Las neuritas distróficas que forman parte de cada placa, pueden derivar de los distintos tipos de neuronas, aunque se ha observado que estas neuritas son muy ricas en acetilcolinesterasa, lo que implica que en su mayoría pertenecen a neuronas colinérgicas, una de las poblaciones celulares más afectadas en la EA (Terry y Katzman 1983). El tiempo de generación de estas placas se desconoce, pero es probable que se desarrollen de forma gradual en un margen de tiempo considerable, básicamente años (Selkoe 2001a).

Existen varios tipos de placas de amiloide, según su grado de madurez. En un principio se forman las placas difusas (depósitos de A β sin la apariencia fibrilar característica de las placas neuríticas y con una distribución cerebral más amplia), en las que únicamente se encuentra A β_{42} , la forma más amiloidogénica (Tanzi y cols. 2004; Saito y cols. 2005; Usui y cols. 2009), en agregados de pequeño tamaño y no están presentes ni neuritas distróficas ni glía activada (Yamaguchi y cols. 1988; Fraser y cols. 1993; Roher y cols. 1996). Esta subclase de depósitos aparece tanto en los estadios tempranos como en los tardíos, y aparentemente son lesiones prematuras, que eventualmente pueden evolucionar hacia la formación de las clásicas placas neuríticas como lo sugieren las observaciones realizadas en ratones transgénicos que expresan mutantes de la APP humana (Selkoe 2001b) así como en estudios inmunohistoquímicos de pacientes con síndrome de

Down (Lemere y cols. 1996). Estos enfermos presentan, frecuentemente placas difusas en la adolescencia, pero no las clásicas placas neuríticas, que aparecen por lo general dos décadas después

Las placas neuríticas o seniles propiamente dichas presentan A β de 40 y 42 aminoácidos y todos los componentes descritos anteriormente, y solo se encuentran en estadios más avanzados de la enfermedad. El mecanismo que regula la aparición de estos dos tipos de placas no se conoce, aunque se cree que las difusas evolucionan hasta formar las neuríticas por compactación del A β e incorporación de componentes que interaccionan con él (Selkoe 1994a). Algunos autores sin embargo, apoyan la hipótesis de que el A β que forman placas seniles es diferente del que forma las placas difusas, y que incluso tienen un distinto origen celular (Wisniewski y cols. 1996).

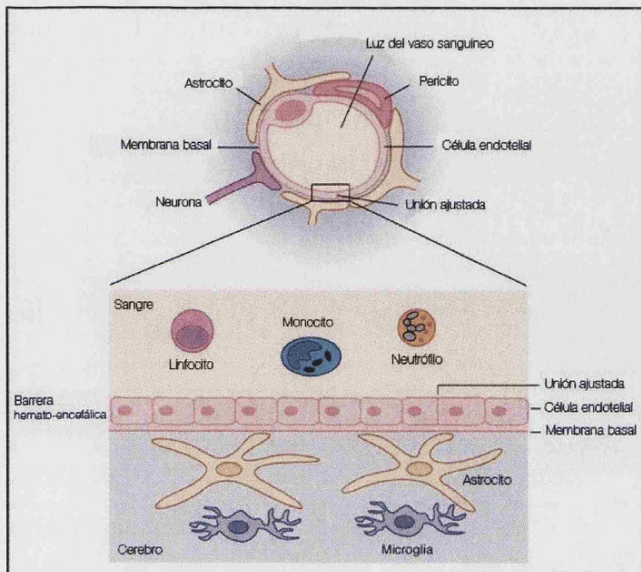
2.2.2. Cambios en la barrera hematoencefálica

Las células cerebrales están protegidas de fluctuaciones en la composición de la sangre y del acceso de sustancias potencialmente tóxicas por dos tipos de barreras, la barrera hematoencefálica (BHE) que separa sangre y cerebro, localizada en los capilares cerebrales, y la barrera entre la sangre y el LCR a nivel de los plexos coroideos. Ambas son barreras tanto físicas como metabólicas que impiden el acceso de numerosas moléculas y fármacos al SNC, manteniendo así su homeostasis, permitiendo el paso de nutrientes y oxígeno. Entre el LCR y el cerebro no existe barrera alguna debido a que ambos compartimentos están separados por células unidas por uniones no estrechas que permiten el libre paso de moléculas (Zlokovic 2008).

La BHE está formada por capilares continuos, con células endoteliales especializadas íntimamente unidas mediante uniones estrechas, sin poros ni fenestras, y rodeados de pericitos y de células astrogiales (Figura 10). Este endotelio tiene al menos tres tipos de unión célula-célula: uniones de hendidura (GAP junctions), uniones adherentes y uniones estrechas.

En íntima asociación con la célula endotelial, el podocito (proceso en forma de pie de los astrocitos) cumple un papel de protección de la BHE, ya que favorece la estructuración del endotelio como barrera y también regula su respuesta a la hipoxia o a la hipoglucemia modificando su permeabilidad. Así, la BHE, aunque estructuralmente está constituida por las células endoteliales, funcionalmente está regulada por la glía (Von Bernhardi 2004).

Figura 10: Representación esquemática de la BHE.



Se conoce relativamente poco sobre el mecanismo patogénico por el cual las células endoteliales cerebrales contribuyen tanto a la demencia y a las lesiones en cerebros con EA, como a la formación de placas seniles y los cambios neurodegenerativos asociados a la patología de tau. De acuerdo a éste concepto, el sistema vascular cerebral se está modificando continuamente durante el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas, con el fin de mantener un

flujo sanguíneo cerebral adecuado y una perfusión cerebral, aunque el proceso de crecimiento vascular y los mecanismos de reparación son todavía desconocidos (Zlokovic 2002). De esta forma, la disfunción vascular podría jugar un papel crítico en la EA. Datos recientes sobre imágenes de cerebros humanos y de modelos animales sugieren que la disfunción cerebrovascular puede preceder al deterioro cognitivo y a los cambios neurodegenerativos en la EA y en modelos animales de EA. El descenso en el flujo sanguíneo cerebral afecta negativamente a la síntesis de proteínas requeridas para la memoria y el aprendizaje y puede eventualmente producir daño neurítico y muerte neuronal (Bell y Zlokovic 2009).

Por lo tanto, la neurodegeneración es una consecuencia de un flujo sanguíneo cerebral inadecuado (hipoperfusión), metabolismo cerebral alterado y fallo en las funciones fisiológicas del endotelio cerebral que constituye parte de la BHE. Por todo ello, el sistema vascular del SNC tiene un papel principal en la patogénesis de la demencia en la EA, al sufrir además una disminución en el aclaramiento de A β en el cerebro a través de la BHE. Esta alteración en el transporte de A β a través de la BHE, es probablemente un evento tardío en la EA, posiblemente resultante de un desorden vascular del endotelio cerebral específico de la enfermedad y asociado con una angiogénesis aberrante, una senescencia celular y cambios en un conjunto de genes cuya expresión está alterada en la EA (Zlokovic 2002).

El mecanismo de aclaramiento de A β desde el cerebro se lleva a cabo por las células de la unidad neurovascular, y un descenso de dicho transporte puede llevar a la acumulación de A β en los vasos sanguíneos (angiopatía amiloide cerebral) y en el parénquima cerebral, contribuyendo al declive cognitivo y a la progresión de la EA.

A su vez, la angiopatía amiloide cerebral puede alterar o interrumpir la integridad de las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales, resultando en micro y macro hemorragias intracerebrales que aumentan el proceso neurodegenerativo y la respuesta inflamatoria (Bell y Zlokovic 2009).



Figura 11: Angiopatia amiloide que afecta a los vasos meníngeos y parenquimales. Amiloide rodeando capilares.

La unidad neurovascular se compone de todos los componentes celulares del cerebro, incluyendo neuronas, astrocitos, endotelio cerebral, pericitos, células musculares lisas vasculares, microglía y macrófagos perivasculares, siendo la comunicación dinámica entre ellas, de vital importancia para el normal funcionamiento del cerebro (Bell y Zlokovic 2009).

Los defectos en la anatomía vascular observados en la EA apoyan la importancia del desorden vascular en la patogénesis de la EA. Se produce atrofia e irregularidades de arteriolas y capilares, inflamación e incremento de vesículas pinocíticas en células endoteliales, incremento de colágeno IV, heparán sulfato proteoglicanos y depósitos de laminina en la membrana basal, disrupción de la membrana basal y reducción total de la densidad microvascular. También se ha observado un descenso de los marcadores endoteliales CD34 y CD31 observado en cerebros de EA, lo que sugiere que hay una degeneración extensiva en el endotelio durante la progresión de la enfermedad (Bell y Zlokovic 2009).

Se han encontrado también muchas secciones de células endoteliales inmaduras encima de un endotelio preexistente en el lumen de los capilares. El citoplasma de las células endoteliales inmaduras en los pacientes con EA se caracteriza por la acumulación de fibrillas de amiloide, lo que sugiere que estas células pueden ser una fuente importante de A β en el cerebro derivado de la circulación (Frontczak-Baniewicz y cols. 2006).

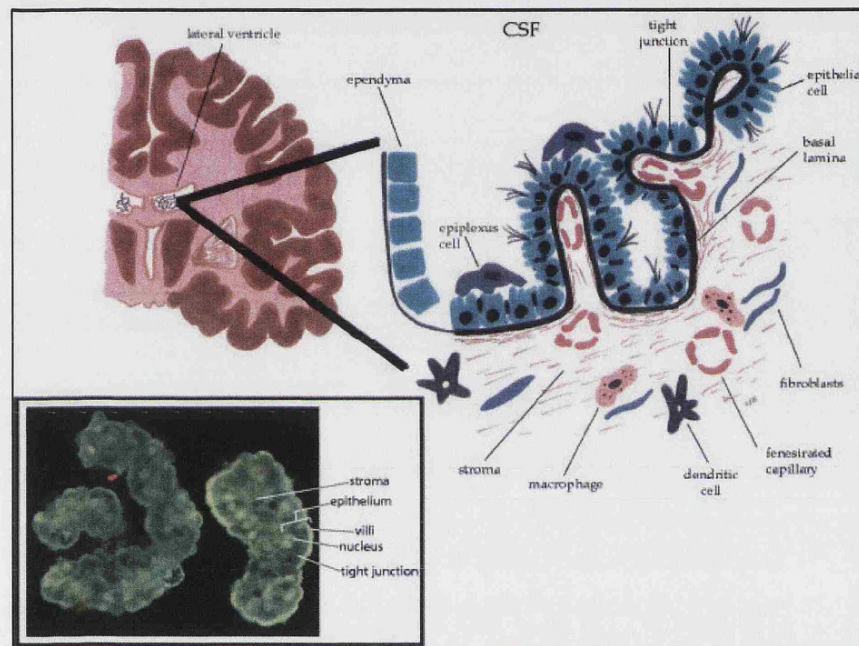
2.2.3. Cambios en la barrera sangre-LCR

La barrera sangre-LCR está formada por los plexos coroideos, el aracnoides y los órganos circumventriculares. Estos tejidos tienen capilares fenestrados y la barrera está formada por las uniones estrechas entre las células epiteliales de los plexos, que previenen que la mayoría de

sustancias atraviesen la capa celular y entren al LCR, aunque su resistencia es menor que la generada en el endotelio de la BHE (Serot y cols. 2003).

La capa epitelial de los plexos coroideos descansa sobre una membrana basal epitelial rodeada por un estroma delgado con numerosas fibras de colágeno, escasas células dendríticas, macrófagos, fibroblastos y largos capilares con un endotelio fenestrado y se continúa con la capa de células endodimales que cubren los ventrículos (Figura 12).

Figura 12: Ilustración morfológica de los plexos coroideos dentro de los ventrículos laterales (izquierda) y como se define por su fenotipo celular (derecha). Los plexos coroideos se extienden por la capa endodimal de la pared de los



ventrículos formando una capa continua de células epiteliales cuboidales, las cuales presentan numerosas vellosidades en su superficie apical. Las células epiteliales están unidas formando uniones estrechas (tight junctions). En el estroma se encuentran macrófagos, células dendríticas y fibroblastos. En el recuadro inferior se muestra una imagen de plexos coroideos capturada con un microscopio confocal (Emerich y cols. 2005).

Además, los plexos coroideos están altamente innervados, recibiendo fibras adrenérgicas, colinérgicas, peptidérgicas y serotoninérgicas, y las mitocondrias son muy numerosas en los polos basal y apical (Serot y cols. 2003).

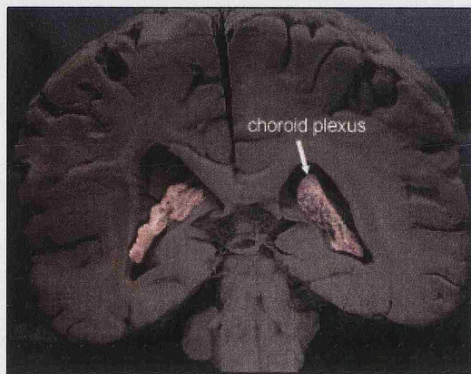
El tejido de los plexos coroideos son unas estructuras intraventriculares compuestas de vellosidades recubiertas por una capa simple de epitelio cuboide ciliado (células endodimales modificadas). El papel principal del plexo coroideo es sintetizar y secretar el fluido cerebroespinal (CSF) o LCR, mantener estable su composición reemplazándolo 4-5 veces al día a través del flujo continuo hacia el espacio subaracnoideo y su salida al sistema venoso por las vellosidades aracnoideas (Speake y cols. 2001).

Además, los plexos coroideos sintetizan numerosas moléculas (Aldred y cols. 1995; Stopa y cols. 2001), transportan nutrientes desde la sangre al LCR, reabsorben y retiran productos generados por el metabolismo cerebral como desechos metabólicos, sustancias extrañas, y excesos de

neurotransmisores del LCR actuando como un sistema de filtración, y participan en la inmunovigilancia del cerebro al producir diversos factores neurotróficos (Borlongan y cols. 2008; Emerich y Borlongan 2009). Además muestran una capacidad de secuestro de metales pesados tóxicos e iones metálicos (Serot y cols. 2003).

Entre las proteínas que sintetizan se encuentran la transtirretina, transferrina, citoquinas y factores de crecimiento como $TGF\alpha$, $TGF\beta$, bFGF, TNF, y IGF-II. También transportan activamente desde la sangre al LCR numerosas moléculas tales como folato, glucosa, vitaminas B6, B12 y C y probablemente vitamina E.

Figura 13: Fotografía de plexos coroideos.



Están descritas 3 regiones de plexos coroideos: plexos coroideos del 3er ventrículo ó plexos de Vicq d'Azyr, en el techo del tercer ventrículo, y a su vez subdividido en dos cordones, los cuales alcanzan el foramen derecho e izquierdo de Monro y atraviesan por la superficie interna de cada ventrículo lateral. Además existen 2 pequeños plexos coroideos en el techo del 4º ventrículo (Serot y cols. 2003).

El tejido de los plexos coroideos, a pesar de su poco peso, parece jugar un importante papel en la homeostasis cerebral, y sufre importantes modificaciones morfológicas durante el envejecimiento. El envejecimiento de los plexos coroideos se caracteriza por la atrofia epitelial, un descenso de actividades enzimáticas y en la secreción de LCR, un engrosamiento de la membrana basal (principalmente la membrana basal epitelial), y la fibrosis irregular del estroma. Estas modificaciones morfológicas, suponen efectos adversos en las funciones cerebrales, en parte debido a que se ven comprometidas la capacidad depurativa del LCR (Serot y cols. 2003). En los plexos coroideos humanos, el tamaño de las células epiteliales decrece en un 10% con la edad, desde 15 μm en recién nacidos a 13.7 μm en adultos (Serot y cols. 2000). Con la edad, el citoplasma de las células epiteliales contiene inclusiones fibrilares llamadas cuerpos de Biondi y depósitos de lipofusina, cuya presencia altera la función celular (Wen y cols. 1999).

Los núcleos son irregulares y aplanados, y la membrana basal está engrosada. La membrana basal epitelial es regular en recién nacidos, pero se vuelve irregular y se engrosa. El estroma también se engrosa y contiene fibras de colágeno, cuerpos de hialina y calcificaciones. Algunas veces se pueden apreciar largas y numerosas formaciones císticas. Las paredes arteriales también se engrosan en la zona media y adventicia y las fibras elásticas se fragmentan (Serot y cols. 2003).

INTRODUCCIÓN

Las funciones de los plexos coroideos son dependientes de energía y con la edad la producción energética disminuye, puesto que decrece la actividad de las enzimas involucradas en la glicólisis anaerobia y el ciclo de Krebs, alterando por tanto el metabolismo dependiente del catabolismo de la glucosa. Se produce un incremento dependiente de la edad en el número de células epiteliales deficientes en citocromo C oxidasa, alterando la cadena respiratoria mitocondrial y reduciendo la producción celular de ATP (Serot y cols. 2003).

Estas alteraciones anatómicas y enzimáticas podrían llevar a una disminución en la secreción de LCR, la cual desciende en un 45% en modelos animales. En el hombre, el volumen de LCR secretado también disminuye con la edad, desde 0.41ml/minuto a los 28 años de edad, a 0.19 ml/min a los 77 años de edad. Como resultado de la edad, el recambio o renovación del LCR se estima que se produce 6 veces al día en adultos jóvenes comparado con las 1,7 veces al día de individuos mayores de edad (Tanna y cols. 1991).

También se produce un descenso considerable en el aclaramiento de la proteína A β . Como consecuencia, se incrementan significativamente los niveles cerebrales de las proteínas A β_{40} y A β_{42} que podrían estar relacionados con la reducción en el aclaramiento del LCR (Serot y cols. 2003).

Durante la EA, los plexos coroideos presentan alteraciones similares a aquellos producidos por la edad, pero agravados. La atrofia epitelial es significativa, el tamaño de las células se reduce un 22% comparado con controles de la misma edad. Las células epiteliales contienen numerosas vacuolas de lipofusina y cuerpos de Biondi. El porcentaje de células epiteliales que contienen cuerpos de Biondi se incrementa significativamente en pacientes con EA. Hay también numerosas inclusiones de Biondi en la capa ependimal. La membrana basal epitelial es muy irregular y engrosada, incrementando su grosor un 28% comparado con controles de la misma edad. El estroma de las vellosidades es irregularmente fibrótico, y su grosor puede aumentar varias decenas de μ m. Los plexos coroideos contienen vasos con paredes engrosadas, cuerpos de hialina y calcificaciones (Serot y cols. 2003).

Estas modificaciones anatómicas sugieren una reducción en las capacidades funcionales de los plexos coroideos. Las funciones de secreción, síntesis y transporte, se reducen drásticamente, lo que se traduce en un descenso en la velocidad de renovación del LCR. Debido a la atrofia cerebral y a la consecuente dilatación ventricular, la renovación del LCR se produce cada 36 horas en pacientes con EA, lo que resulta en un descenso del secuestro de proteína A β , y un incremento del proceso de glicación y de estrés oxidativo. De hecho, los niveles de ácido ascórbico y de α -tocoferol, los dos principales depuradores de radicales libres del LCR, están reducidos en EA, por lo que estos valores anormales pueden explicar el mayor estrés oxidativo que se produce en los cerebros con EA y el descenso en las capacidades antioxidantes del LCR en EA (Serot y cols. 2003). Esta reducción en la

producción y renovación del LCR también puede favorecer la glicación de proteínas, lo que promueve su agregación, y favorece la polimerización de la proteína tau, y la transformación fibrilar de la proteína A β . De hecho, el cerebro de enfermos con EA contiene 3 veces más productos avanzados de glicación (AGE) que los controles, y están presentes en las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Vitek y cols. 1994).

La reducción en la renovación del LCR, el incremento de la glicación de proteínas y la disminución del aclaramiento de la proteína A β a nivel de los plexos coroideos, podrían entre todos inducir la formación y retención de oligómeros de A β en el cerebro (Serot y cols. 2003). Todas estas observaciones sugieren que uno de los posibles mecanismos involucrados en el daño neuronal inducido por A β es la disfunción de la barrera sangre-LCR.

2.3. HIPERFOSFORILACIÓN DE TAU

La mayoría de las neuronas afectadas en la EA, presentan entramados u ovillos neurofibrilares, muy poco solubles, que son acúmulos densos de filamentos proteicos lineales de aproximadamente 10 nm y pares de filamentos que se enrollan formando hélices con una periodicidad media de 160 nm (Selkoe 2001a). Estos ovillos neurofibrilares están formados por filamentos helicoidales pareados, compuestos principalmente de la proteína hidrofílica tau asociada a microtúbulos, que se encuentra glicosilada de manera anormal (Ihara y cols. 1986; Wolozin y cols. 1986; Ledesma y cols. 1994; Yan y cols. 1994) e hiperfosforilada (Grundke-Iqbal y cols. 1986), y debido a ello plegada de un modo anómalo (Hirokawa y cols. 1988; Julien y Mushynski 1998; Buée y cols. 2000; Morishima-Kawashima y Ihara 2002) (Figura 14).

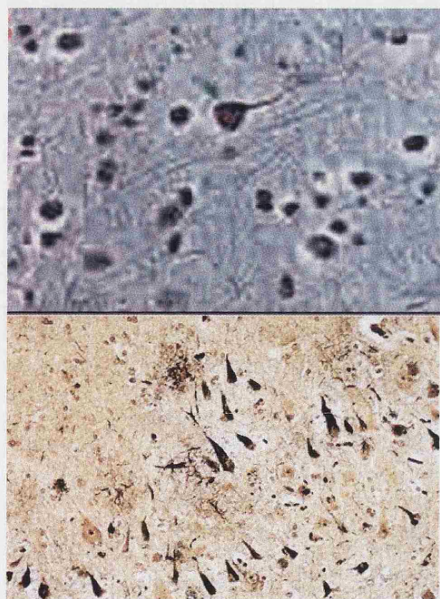


Figura 14: Fotografía de ovillos neurofibrilares en el hipocampo. La formación de ovillos de neurofibrillas se inicia en la región del hipocampo en la que reside la función de la gestión de la memoria.

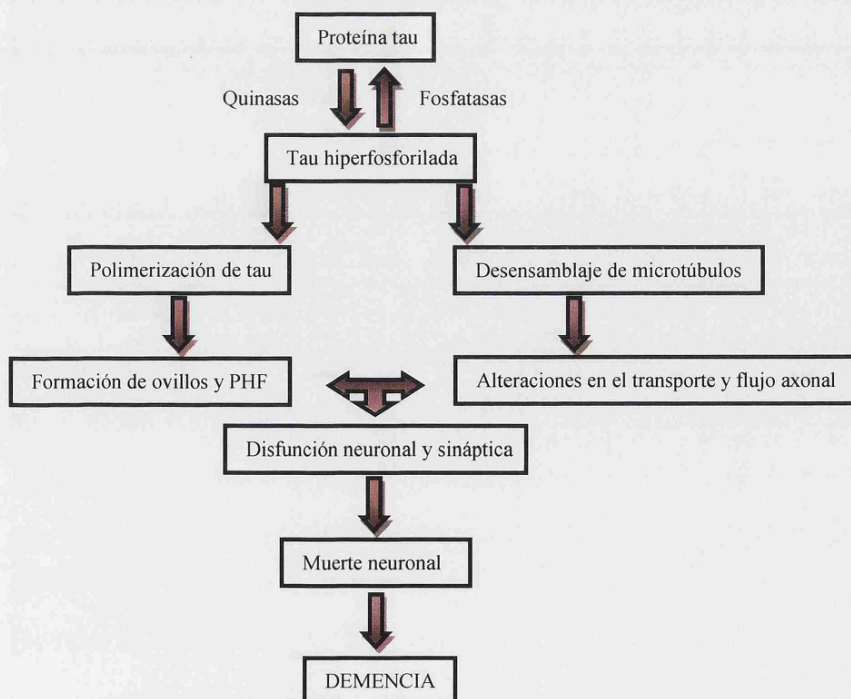
Los ovillos neurofibrilares aparecen en el parénquima cerebral, principalmente en las áreas entorrinal e hipocampal, la neocorteza, el locus coeruleus y el rafe dorsal (Terry y Masliah 1994), presentando una distribución por capas muy característica, por ejemplo en las capas II y IV de la corteza entorrinal y en las II, III y V de la neocorteza temporal (Arnold y cols. 1991).

La localización habitual de estos ovillos es siempre intracelular, pero ocasionalmente se encuentran extracelularmente, liberados por la célula como resultado de la muerte neuronal (Gómez Ramos y cols. 2009).

Se han observado diferentes polipéptidos de tau mediante el análisis de proteínas procedentes de extractos cerebrales. Esto se debe por un lado a que la proteína tau es codificada por seis polipéptidos generados por procesamiento alternativo del ARN (Himmler 1989) y por otro a los diferentes niveles de fosforilación de la proteína (Goedert y cols. 1992).

La función normal de la proteína tau es ensamblar y estabilizar microtúbulos manteniendo la estructura íntegra del citoesqueleto (Lee y cols. 2001), aunque también puede jugar un papel importante regulando procesos como el transporte axonal (Mandelkow y cols. 2004). Para el correcto funcionamiento de tau es importante la regulación de su estado de fosforilación. En la fosforilación normal de tau están implicadas actividades tanto de quinasas como de fosfatasas. Una hiperactividad de quinasas paralela a una reducción en la actividad de fosfatasas, da lugar a una pérdida en el balance a favor de la fosforilación que conduce a la agregación de tau y su disociación de los microtúbulos. Esto reduce su habilidad para estabilizar los microtúbulos, por lo que se produce la desestabilización del citoesqueleto y, por ende alteraciones en la geometría celular, el transporte intracelular y en el último término, la viabilidad neuronal (Smale y cols. 1995; Troncoso y cols. 1996; Evans y cols. 2000) (Figura 15).

Figura 15: Proteína tau en la EA. La fosforilación de la proteína tau está regulada por un balance entre múltiples quinasas y fosfatasas. La hiperfosforilación de tau por un lado retiene a la proteína tau normal y a los microtúbulos,



provocando la desestabilización de éstos y alteraciones en el transporte axonal, y por otro lado provoca que se agregue en fibras insolubles. Tanto la formación de ovillos como el desensamblaje de microtúbulos altera la función sináptica y neuronal (Adaptado de Blennow y cols. 2006).

La fosforilación anormal de tau en enfermedades neurodegenerativas está asociada a sitios de fosforilación serina/treonina dirigidos por prolina (Lee y cols. 2001). Se han descrito al menos 77 sitios posibles de fosforilación de tau en residuos de serina o treonina, como se observa en la Figura 16.

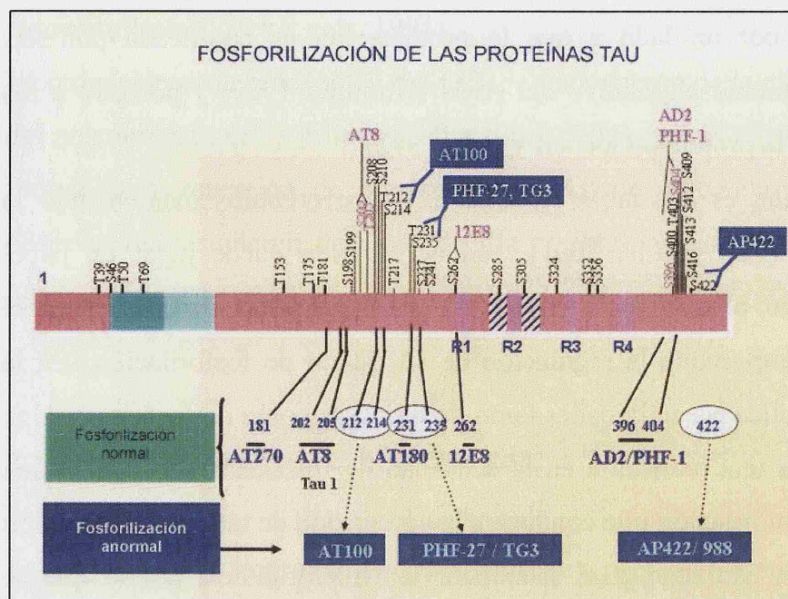


Figura 16: En el cerebro humano, las proteínas tau se presentan como seis isoformas de 352 a 441 residuos de aminoácidos que provienen todas ellas de la expresión de un único gen *TAU* localizado en el brazo largo del cromosoma 17. En la EA y otras taupatías se produce un fenómeno de hiperfosforilación y/o de fosforilación anormal que en definitiva, es el responsable de la formación de los complejos proteínas tau-PHF.

La asociación mecanicista entre las placas seniles y los ovillos neurofibrilares se ha mantenido como una incógnita por muchos años, aunque existía evidencia que el depósito de A β fibrilar inducía la fosforilación de tau seguida de la neurodegeneración progresiva de los procesos neuronales. Hoy se conoce que A β es capaz de activar a quinasas capaces de fosforilar tau, tales como GSK3 (Hernández y Ávila 2008; Hernández y cols. 2009) y CDK5 (Álvarez y cols. 2001). Se describe además, una actividad aumentada de GSK3 (Hooper y cols. 2008; Hernández y cols. 2009) y CDK5 (Tsai y cols. 2004) en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA, y también que la inhibición farmacológica de CDK5 atenúa la neurotoxicidad de A β (Camins y cols. 2006). Por su parte, la GSK3 hiperactivada promueve hiperfosforilación de tau (Ávila 2004; Hernández y Ávila 2008), aumenta la actividad de β - y γ -secretasa que conduce a un incremento de la formación de A β , provoca una mayor cantidad de microglía reactiva en la zona cercana a las placas amiloideas y produce deterioros en el aprendizaje y la memoria (Hooper y cols. 2008). Es decir, un aumento en la actividad de GSK3 contribuiría a desencadenar y acrecentar muchos de los rasgos patológicos con los que cursa la EA. Sin embargo, a día de hoy, el papel de GSK3 en el origen de la enfermedad está por determinar con mayor precisión.

En conjunto, estos resultados indican que tau tiene un papel clave en la generación de neuritas distróficas en respuesta al A β . Recientemente, además se mostró que la presencia de tau es esencial

para la neurotoxicidad inducida por A β , de tal manera que, en animales transgénicos sin tau, las neuronas hipocampales no degeneraban cuando eran tratadas con A β , mientras la neurotoxicidad era restaurada al re-expresar tau (Von Bernhardi 2005).

La hiperfosforilación de la proteína tau caracteriza a un conjunto de enfermedades neurodegenerativas llamadas taupatías, incluyendo a la EA (Buée y cols. 2000), aunque se han identificado estos ovillos en cerebros de pacientes con otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Greenfield y Bosanquet 1953), la demencia pugilística (Corsellis y cols. 1973) y otras enfermedades menos frecuentes como desórdenes metabólicos o retardo mental (Popovitch y cols. 1990), siendo muy raro encontrarlos en neocorteza de cerebros de individuos sanos de edad avanzada. Están descritos en la bibliografía algunos casos de EA sin ovillos neurofibrilares, que suponen un 10-20% de los casos (Selkoe 1994b) y se ha encontrado correlación entre el número de estos ovillos y el grado de demencia, así como la duración de la enfermedad (Gómez-Isla y cols. 1997).

Además, mientras que la distribución de A β es aleatoria y no sigue aparentemente ningún patrón, los ovillos neurofibrilares por el contrario siguen un patrón de afectación regional totalmente predecible con mínimas diferencias entre individuos, lo que ha llevado a determinar varias etapas histopatológicas tempranas y tardías de la EA. Esta determinación fue realizada por Braak y Braak (Braak y Braak 1996) y se ha dividido en 6 estadios durante el curso de la EA según la presencia y localización de neuronas con degeneración neurofibrilar. Esta distribución en estadios neuropatológicos se correlaciona con la evolución clínica de la enfermedad, demostrándose el paralelismo entre la disminución de memoria con cambios neurofibrilares y la formación de placas neuríticas en la corteza entorrinal y el hipocampo (Jiménez y cols. 2001).

Así mismo, la presencia isocortical de estos cambios se correlaciona con alteraciones clínicas severas (estadios V y VI), mientras que el estado transentorrinal probablemente corresponde a estadios silenciosos de la enfermedad (estadios I y II). Estos estadios actúan como criterios neuropatológicos para confirmar la EA (Jiménez y cols. 2001).

Un descubrimiento de especial relevancia es el descrito muy recientemente en el que se han detectado propiedades infecciosas de la proteína tau. En este estudio extrajeron secciones de cerebro de ratones que expresaban formas mutantes de proteína humana tau, y fueron inyectados en regiones específicas del cerebro de ratones sanos. Los análisis mostraron que esto inducía a las proteínas humanas tau normales de los ratones sanos a formar ovillos neurofibrilares, los cuales eran capaces de expandirse a regiones cercanas del cerebro. Esto sugiere que la proteína tau podría compartir características con las proteínas priónicas que causan la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

Esto sugiere que los ovillos de proteínas que se forman en el cerebro y que causan los síntomas de la enfermedad, pueden tener propiedades contagiosas dentro del tejido cerebral. Este hecho podría explicar cómo los ovillos se extienden desde una región del cerebro a otra durante el curso de la EA y otras enfermedades consideradas como taupatías (Clavaguera y cols. 2009).

2.4. INFLAMACIÓN

Otra característica fundamental de la EA es la aparición de una respuesta inflamatoria persistente y exacerbada. La presencia de microglía y citoquinas inflamatorias, entre otros elementos, aparecen asociadas a las placas seniles en biopsias cerebrales postmortem de pacientes con EA, pero no en individuos no dementes (McGeer y McGeer 1998). Del mismo modo se han encontrado signos de activación de la microglía en modelos murinos de EA que desarrollan abundantes placas de amiloide (Bornemann y cols. 2001). De hecho, se sabe que el A β activa a la microglía, ya sea activando la fagocitosis e induciendo daño sobre neuronas vecinas en forma directa, o agrediéndolas indirectamente, al liberar citoquinas inflamatorias, óxido nítrico y otras neurotoxinas capaces de dañar neuronas cercanas (Von Bernhardi 2005).

La microglía y los macrófagos perivascuales pueden jugar un papel importante en el aclaramiento de A β desde el cerebro, y en el incremento de la inflamación asociada a la EA. Se ha observado que la microglía está significativamente activada en cerebros con EA y localizada en zonas con depósitos de A β , y que su activación temprana en la patogénesis de la EA presenil es beneficiosa en el aclaramiento de A β tóxico desde el cerebro. Sin embargo, según progresa la enfermedad, la activación microglial puede producir inflamación, reducción en el aclaramiento de A β y aumento de la neurodegeneración (Bell y Zlokovic 2009).

Los macrófagos perivascuales son fagocitos presentadores de antígenos, y se ha visto que responden a la inflamación del SNC. De modo interesante, los macrófagos derivados de la sangre de pacientes con EA son menos efectivos en la fagocitosis de A β comparado con células procedentes de controles no dementes (Fiala y cols. 2005). Estos datos sugieren la importancia del papel de la microglía y los macrófagos perivascuales en el aclaramiento de A β , y proporcionan evidencias adicionales de que el A β es transportado a lo largo del espacio perivascular. No se sabe si el papel de estas células en la EA es beneficiosa o perjudicial, y todavía existen controversias (Bell y Zlokovic 2009).

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, existen estudios epidemiológicos que sugieren que el tratamiento prolongado con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) retrasa la aparición y la progresión de la EA (McGeer y McGeer 1996). Basándose en estas evidencias, se propuso que la neuroinflamación podría ser una de las causas de la EA. Si éste fuera el caso, es evidente que tendría importantes implicaciones en la búsqueda de nuevos tratamientos. Alternativamente, la inflamación podría ser consecuencia del proceso patológico y no influir sustancialmente en la progresión de la enfermedad. También se ha considerado la posibilidad de que la inflamación induzca una respuesta inmune beneficiosa que pudiera limitar el avance de la enfermedad, en cuyo caso, la inhibición del proceso inflamatorio no sería deseable.

El desarrollo de anticuerpos específicos en el año 1980 hizo posible identificar en material de autopsia de enfermos de Alzheimer, la presencia de proteínas del complemento y la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad en la microglía alrededor de las placas de A β (Eikelenboom y Stam 1982; McGeer y cols. 1988). Desde entonces muchos estudios han confirmado la expresión anómala de citoquinas, proteínas del complemento etc., asociadas con la respuesta inmune e inflamatoria (Akiyama y cols. 2000). Un descubrimiento clave en relación a la inflamación en la EA ha sido la demostración de que el A β es un potente activador del complemento (Rogers y cols. 1999). La activación del complemento en la EA se había demostrado previamente (Eikelenboom y Stam 1982), pero no se habían encontrado anticuerpos asociados con las lesiones histopatológicas de la EA. Posteriormente se pudo demostrar que el A β activa el complemento por un mecanismo distinto a la clásica activación por anticuerpos y que consiste en su unión a la cola de colágeno de C1q (Webster y cols. 1999). La activación del complemento da lugar a la producción de toxinas anafiláticas que a su vez amplifican el proceso inflamatorio. Además de iniciar la respuesta inmune activando el complemento, el A β participa en el proceso neuroinflamatorio a través de otros mecanismos como son la activación de factores de transcripción como NF-kB y AP-1 (Ferrer y cols. 1997; Kaltschmidt y cols. 1997), mediante la activación del receptor CD40 (Tan y cols. 1999) y mediante el receptor gamma activador de proliferación de peroxisomas (PPARgamma) (Sun y cols. 2002).

Más recientemente, estudios de genómica, comparando la expresión de genes en regiones vulnerables de pacientes de EA y donantes controles de edad aproximada, han confirmado estos hallazgos y desvelado un aumento de expresión de otros genes relacionados con procesos inflamatorios, como es el caso de IL-1a, IL-1b, COX-2 o NF-kB (Colangelo y cols. 2002; Blalock y cols. 2005). Sin embargo, estos estudios no permiten discriminar si el proceso inflamatorio aparece antes de la patología o es una reacción compensatoria al proceso degenerativo. Hay que

tener en cuenta, además, que muchos de los factores inmunes y proteínas inflamatorias tienen múltiples funciones y su mera presencia no indica si tiene efectos beneficiosos o perjudiciales.

2.5. CAMBIOS Y PÉRDIDA DE CONEXIONES SINÁPTICAS

Durante muchos años, la demencia se atribuyó a la muerte celular, pero hoy en día se sabe que una de las principales características neuropatológicas de los cerebros de individuos con EA es una significativa pérdida de conexiones sinápticas en muchas regiones del neocórtex y el hipocampo. La pérdida sináptica en los cerebros afectados de EA demuestra una fuerte asociación con las habilidades cognitivas y pueden proporcionar una mejor correlación con la demencia o declive cognitivo en la EA que con la acumulación de placas de amiloide (Scheff y cols. 2005). De hecho, muchos estudios han examinado la relación entre grado de déficit cognitivo y número de placas seniles y ovillos neurofibrilares, y mientras que en general, el número de ovillos se correlaciona mejor que el número de placas con la severidad de la demencia, posiblemente las mejores correlaciones estadísticas ocurren como ya se ha comentado, entre medidas de densidad sináptica y grado de demencia (DeKosky y Scheff 1990; Terry y cols. 1991; Selkoe 2000b; Coleman y Yao 2003).

Además, el descenso del número de sinapsis y la densidad parece desproporcionado con relación a la pérdida de células neuronales (Davies y cols. 1987; DeKosky y Scheff 1990; Bertoni-Freddari y cols. 1996), lo que sugiere que la reducción de los terminales sinápticos puede preceder a la muerte de neuronas en el proceso de la enfermedad. De hecho, recientes estudios han demostrado que los cerebros de individuos con EA tienen sinapsis disfuncionales incluso antes de que la degeneración sea visible (Harold y cols. 2009).

También existen diversos estudios en modelos animales de EA en los que se ha visto que los oligómeros solubles de A β interfieren con la función sináptica antes de que ocurran los daños sinápticos estructurales y se induzca la muerte neuronal (revisado en Walsh y Selkoe 2004).

Unido a ello, la transmisión y densidad sináptica en sinapsis colinérgicas están muy disminuidas en estos pacientes. Parte importante de esta disminución corresponde a un déficit colinérgico presináptico, reflejo de la pérdida de neuronas colinérgicas. Sin embargo, la pérdida temprana de la memoria también podría deberse a un fallo sináptico causado por oligómeros de A β (Von Bernhardi 2005).

A pesar de que se producen alteraciones en numerosos neurotransmisores al progresar la enfermedad, los síntomas tempranos parecen correlacionarse con la disfunción de sinapsis

INTRODUCCIÓN

colinérgicas y glutamatérgicas. Esta disfunción y pérdida de sinapsis ocurriría antes de la formación de placas de A β . El A β también podría inducir una liberación excesiva de aminoácidos excitatorios como el glutamato desde las células gliales, que dañarían las neuronas cercanas por excitotoxicidad. La activación exagerada de receptores glutamatérgicos del tipo de N-metil-D-aspartato (NMDA) produce un incremento del calcio intracelular, y resulta en la activación de la Oxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS), favoreciendo el daño oxidativo, y con ello la muerte celular (Von Bernhardt 2005).

Sin embargo, el mecanismo del daño sináptico es desconocido, investigaciones recientes sugieren que hay evidencias tempranas de daño dendrítico y sináptico, con disminución del número de sinapsis, y que serían los oligómeros de A β de tamaño pequeño (en contraste a las placas grandes), los que podrían producir disfunción neuronal. Por lo tanto, los depósitos difusos de amiloide podrían ser los responsables de los problemas cognitivos tempranos en la EA y de alterar la integridad sináptica (Scheff y Price 2003).

También se ha observado una reducción significativa en la expresión de genes relacionados con el tráfico de vesículas sinápticas en pacientes con EA, sugiriendo un posible fallo en la función sináptica normal. El fallo en la ejecución del acoplamiento de vesículas sinápticas específicas es esencial para la liberación de neurotransmisores y la conectividad sináptica llevaría a la disfunción del circuito neural y a una disminución en el estado cognitivo en la EA (Scheff y Price 2003).

Además se han observado modificaciones en las espinas dendríticas en zonas del hipocampo en modelos animales APP/PS1. Las espinas dendríticas representan los principales elementos postsinápticos en la sinapsis excitatoria en el córtex cerebral y son fundamentales para la memoria, el aprendizaje y la cognición. Recientes evidencias indican que se produce un aumento de la densidad de espinas en las proximidades de las placas de A β . Esto se podría explicar por la liberación de factores neurotróficos por los astrocitos que rodean las placas. Se ha especulado que este crecimiento de nuevas espinas en las proximidades de las placas, sería un mecanismo compensatorio a la pérdida de neuronas que se produce dentro de las placas. Paralelamente, se ha observado un descenso significativo en la frecuencia de espinas grandes en regiones libres de placas en estos ratones. Las espinas grandes son consideradas como responsables de la memoria a largo plazo, por lo que, a pesar de encontrarse un incremento en la densidad de espinas en las proximidades de las placas de A β , un descenso generalizado en la frecuencia de espinas grandes en las regiones libres de placas, que corresponden a más del 95 % del neuropilo, pueden tener una mayor influencia en el deterioro cognitivo observado en los ratones APP/PS1 (Knafo y cols. 2009).

2.6. ESTRÉS OXIDATIVO, ALTERACIONES MITOCONDRIALES Y MUERTE NEURONAL

Varios estudios ponen de manifiesto que el daño oxidativo aumenta de forma exponencial con la edad (Judge y cols. 2005; Ma y cols. 2009; Wei y cols. 2009). Aunque el oxígeno es esencial para la vida, sus metabolitos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS), pueden causar un daño celular importante. La generación de radicales de oxígeno es un proceso normal que se asocia a la respiración mitocondrial o como parte de la respuesta inmune, aunque hay situaciones en las que la generación de radicales aumenta, como en procesos inflamatorios o en alteraciones vasculares. Cuando los niveles ROS exceden la capacidad antioxidante de la célula, ocurren unas condiciones deletéreas conocidas como estrés oxidativo. La acumulación de ROS, que incluye H_2O_2 , radicales hidroxilos y el anión superóxido, tiene como consecuencia la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos, daños en el ADN y últimamente se ha visto que puede causar muerte celular vía apoptosis y necrosis (Judge y cols. 2005).

El estrés oxidativo es especialmente importante en el SNC debido a que el cerebro tiene un contenido alto de lípidos, incluyendo muchos ácidos grasos poli-insaturados factibles de ser oxidados, y al hecho de ser un órgano con un consumo de oxígeno muy alto. Por esta razón y debido a que las neuronas tienen una alta tasa metabólica, limitado potencial de regeneración y relativamente bajos niveles de antioxidantes, se piensa que son particularmente vulnerables a las ROS. Los análisis en cerebros humanos postmortem han implicado repetidamente el estrés oxidativo en la muerte neuronal, particularmente en trastornos neurodegenerativos tardíos. Por ejemplo, se ha encontrado incremento en varios biomarcadores de estrés oxidativo en regiones dañadas de tejido cerebral postmortem en pacientes de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad priónica, enfermedad de Huntington y parálisis supranuclear progresiva (Andersen 2004; Barnham y cols. 2004). El análisis de necropsias de pacientes con EA también ha revelado la existencia de todos estos marcadores de estrés en zonas afectadas por la enfermedad junto con abundantes placas neuríticas y ovillos neurofibrilares (Sayre y cols. 2001). Signos de estrés oxidativo también se han encontrado en células extranucleares de pacientes con EA (Mecocci y cols. 2002). Estas observaciones sugieren que el estrés oxidativo no es una mera consecuencia de la enfermedad, sino que puede estar genéticamente determinado (Eckert y cols. 2003).

Desde hace tiempo se piensa que A β juega un papel importante en la generación de ROS (Behl y cols. 1994; Butterfield y cols. 1994) y que ésta puede ser la causa de una mayor vulnerabilidad de ciertas neuronas a la muerte celular por apoptosis. Esta idea se apoya entre otras, en las siguientes observaciones; por una parte, las acciones neurotóxicas de A β se pueden bloquear con antioxidantes

(Kaltschmidt y cols. 1997), y por otra, se ha observado que la sobreexpresión de mutantes humanos de *APP*, *PSEN1* o *PSEN2* producen en cultivos celulares una alteración de la función mitocondrial, un aumento en los niveles de superóxido y apoptosis (Guo y cols. 1999; Perry y cols. 2002). Resultados similares se han obtenido con células neurales y extraneurales procedentes de animales modificados genéticamente para sobreexpresar mutaciones en *APP* o *PSEN* (Guo y cols. 1999; Eckert y cols. 2001a; 2001b; 2003; Matsuoka y cols. 2001).

Los mecanismos moleculares implicados en la inducción de estrés oxidativo y muerte neuronal por A β no son del todo conocidos. Se ha sugerido que A β puede deteriorar la función colinérgica (Li y Smith 1996), y alterar la homeostasis de Ca²⁺ (Guo y cols. 1997; Mattson 2002). Recientemente se ha sugerido que el estrés oxidativo inducido por A β puede ser una presión mitótica que fuerce a ciertas neuronas a una entrada aberrante en el ciclo celular (Klein y Ackerman 2003).

El A β además de jugar un papel importante en la generación de ROS, también está involucrado en la disfunción mitocondrial, aumentando la producción de óxido nítrico en neuronas (Keil y cols. 2004) y en células endoteliales cerebrales (Luth y cols. 2001; Suhara y cols. 2003). El óxido nítrico es una molécula de señalización que regula varios procesos biológicos dentro del SNC, incluyendo la apoptosis, necrosis y excitotoxicidad (Melino y cols. 1997; Brown y Borutaite 2002; Baud y cols. 2004; Figueroa y cols. 2006). Se sabe que el óxido nítrico inhibe la cadena respiratoria mitocondrial e incrementa la expresión y la actividad de la metaloproteasa-9 (MMP-9) (Gu y cols. 2002). La MMP-9 tiene la capacidad de digerir la lámina basal endotelial, proteínas de la matriz extracelular y proteínas de las uniones estrechas, lo que lleva a un daño en la integridad de la BHE y potencialmente a hemorragias cerebrales espontáneas (Bell y Zlokovic 2009). Por ello, la MMP-9 es uno de los mediadores más importantes en los procesos de excitotoxicidad y estrés involucrados en la disrupción de la BHE y barrera sangre-LCR (Rosenberg y cols. 1998; Gasche y cols. 2001; Bell y Zlokovic 2009).

Entre las principales acciones del óxido nítrico y de las especies reactivas de nitrógeno en la mitocondria se encuentran la inhibición específica y reversible del citocromo oxidasa (complejo IV) y la inactivación de otros complejos mitocondriales (I, II, III), la ATP sintasa, la creatina quinasa y la aconitasa (Brown y Borutaite 2002). La disfunción mitocondrial inducida por A β , con el consiguiente déficit energético producido por la inactivación del complejo respiratorio I y la ATP sintasa, podría contribuir a la disfunción neuronal, afectando la actividad de los canales iónicos y transportadores, la neurotransmisión y el transporte neuronal (Von Bernhardi 2005). Secundario a la disfunción mitocondrial se produce estrés oxidativo que puede depender de daño directo o indirecto causado por el A β . Recientemente se ha descrito la interacción del A β con un ligando mitocondrial,

la *A β -binding alcohol dehydrogenase* (ABAD) la cual está incrementada en las neuronas en los pacientes con EA y funcionalmente se le ha asociado a muerte celular (Von Bernhardt 2005).

Algunos autores han sugerido que tanto las alteraciones en la función mitocondrial como el estrés oxidativo son eventos iniciales en la patogenia de la EA (Numomura y cols. 2001; Castellani y cols. 2002), aunque aún se discute si el estrés oxidativo es un mecanismo causal o sólo estaría envuelto en la propagación del daño. De cualquier modo, tanto el estrés oxidativo como la disfunción mitocondrial parecen estar inducidos por A β , y ambos procesos llevan a las células neuronales a entrar en la vía de muerte celular.

3. ANÁLISIS DE GENES CANDIDATOS INVOLUCRADOS EN EL ACLARAMIENTO DEL β -AMILOIDE

En las enfermedades complejas, como la EA, parecen estar implicados múltiples genes, participando cada uno de ellos con un efecto pequeño, de tal modo que para estas enfermedades los modos de herencia son más complejos que las leyes mendelianas. Los estudios de asociación genética, que comparan frecuencias alélicas entre individuos casos e individuos controles no relacionados familiarmente, son muy potentes para detectar factores genéticos de riesgo en estas enfermedades (Brookes 2001; Bertram y Tanzi 2004).

En el caso de la EA, no se debe estudiar sólo la relación de un gen con la enfermedad, sino la relación con ella de distintos módulos funcionales, entendiendo éstos como conjuntos de moléculas que interaccionan entre sí y que llevan a cabo funciones celulares. Los análisis de asociación agrupando los genes en módulos funcionales candidatos, son una herramienta poderosa para estudiar la implicación de funciones celulares concretas en la patogénesis de este tipo de enfermedades (Risch 2000).

En la EA, un ejemplo de módulo funcional podría ser el aclaramiento del A β . En esta enfermedad, el péptido A β se acumula en el cerebro posiblemente debido a un deficiente aclaramiento desde el sistema nervioso central (SNC) hacia la sangre (Zlokovic y cols. 1996; Hammad y cols. 1997; Deane y cols. 2004; Carro y cols. 2005a).

En este contexto, los receptores LRP1 (Tanzi y Bertram 2001) y LRP2/megalina, factores neurotróficos como el IGF-I, que participa en procesos neuroprotectores en el cerebro (Carro y cols. 2001; Trejo y cols. 2001; Carro y cols. 2002; Carro y cols. 2005a) y ligandos de A β , como transtirretina (Buxbaum y cols. 2008), gelsolina (Chauhan y cols. 2008) o ApoE (Strittmatter y cols.

1993b), juegan un papel importante en el proceso de aclaramiento de A β desde el cerebro hacia la sangre y cuya alteración podría producir una acumulación de A β en el cerebro y la consiguiente formación de placas seniles.

Si este módulo funcional es relevante en la etiopatogenia de la EA, se podrán detectar interacciones genéticas entre ellos; es decir, analizando el riesgo asociado a polimorfismos en estos genes podremos observar que el efecto de cada uno sobre el riesgo depende de la forma alélica del resto.

El objetivo final de los estudios de genética es averiguar cuántos son los factores genéticos y sus combinaciones en estas formas de enfermedad. Se prevé que esto permitirá la elaboración de unos “perfiles de riesgo” que podrían emplearse para predecir de una forma fiable la probabilidad de que un individuo pueda o no padecer la enfermedad y/o responder o no a un tratamiento.

Los estudios genéticos aún no son aplicables a la clínica en la forma esporádica de la EA, como para otras enfermedades complejas; sin embargo, no hay duda sobre su papel fundamental para la investigación básica y para el desarrollo de estrategias terapéuticas por la industria farmacéutica. De hecho, en enfermos de cáncer es posible observar distintas respuestas a fármacos entre los pacientes, que podrían ser debidas a variantes genéticas que puedan afectar a las enzimas que los metabolizan, los transportan o que son dianas de los mismos (Abraham y cols. 2006; Blackhall y cols. 2006).

Como ya hemos indicado anteriormente, hay numerosos *loci* ya relacionados con la EA (Bertram y cols. 2007), de forma que es necesario plantearse estrategias de selección de nuevos genes candidatos.

De esta manera, los genes estudiados en esta tesis se seleccionaron por estar relacionados con el aclaramiento del A β , hipótesis apoyada en datos bibliográficos y en datos previos propios.

Un polimorfismo puede dar resultado positivo en los estudios de asociación por un efecto directo o por estar en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo cercano, que sea el factor de riesgo real; por ello, la utilidad de los análisis de asociación aumenta cuanto mayor es la densidad del mapa de marcadores con el que podamos trabajar. Debido a esto, los polimorfismos de único nucleótido, estables, muy abundantes y distribuidos de manera uniforme a lo largo de todo el genoma, son los polimorfismos de elección para los estudios de asociación genética en enfermedades complejas o en farmacogenética. Por ello, para estudiar la asociación genética con la EA de los genes a analizar, seleccionamos en cada uno de ellos diferentes polimorfismos.

Además del estudio de asociación genética, es importante tener en cuenta que para afirmar que un candidato está realmente implicado en la patogénesis de una enfermedad, y saber por qué, es necesario encontrar la conexión funcional entre la variante genética y al menos una función alterada en la enfermedad, por lo que es necesario realizar un estudio funcional de los polimorfismos.

Por todos estos motivos, el LRP2/megalina, sus ligandos gelsolina, transtirretina e IGF-I, y el LRP1, serían genes candidatos para la asociación genética con la EA.

3.1. MEGALINA Y OTROS RECEPTORES DE LA FAMILIA DE RECEPTORES LDL

3.1.1. LRP2/Megalina (LDL receptor-related protein 2)

La megalina es el nombre con el que bautizaron Kerjaschki y Farquhar (Kerjaschki y Farquhar 1982; Kerjaschki y Farquhar 1983) a la glicoproteína de membrana codificada por el cromosoma 2, localización 2q24-31, perteneciente a la familia de los receptores para lipoproteínas de baja densidad (LDL-del inglés Low Density Lipoprotein), que corresponde en la nomenclatura científica al LRP2 (del inglés *Low density lipoprotein receptor-related protein-2*), aunque también se la ha llamado proteína gp330 (Hjalm y cols. 1996; García y cols. 2007). La familia de receptores LDL está compuesta por receptores transmembrana de superficie celular con diversas funciones entre los que se encuentran, además del LRP2 /megalina, el LRP1, LRP1B, VLDLR, ApoER2, LRP4/MEGF7, LRP5, LRP6 y LRP11 (Figura 17).

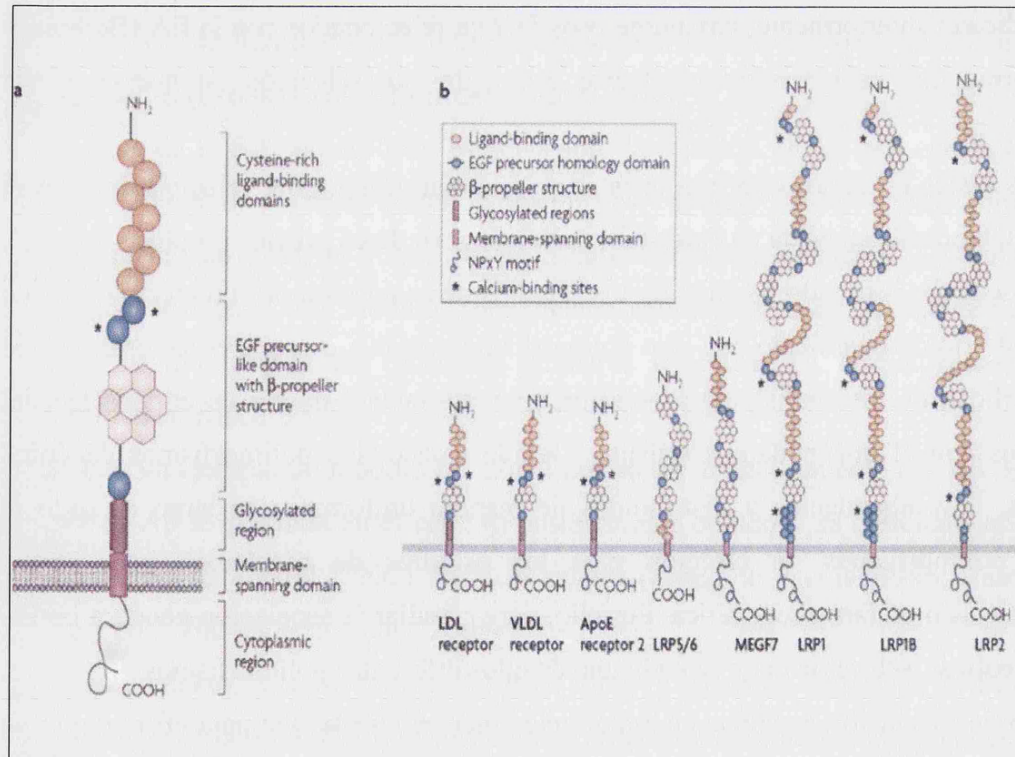


Figura 17: Familia de receptores de lipoproteínas (LDLR). Esquema de la estructura de los miembros de la familia LDLR (b) indicando las diferentes partes que los constituyen (a). La megalina es el receptor que posee la cola citoplasmática más extensa y guarda una gran similitud con LRP1.

INTRODUCCIÓN

El LRP2/megalina es un receptor poliespecífico multiligando integrado en la membrana, cuya función principal es de receptor endocítico para lipoproteínas. Consta de un largo dominio extracelular amino-terminal, con cuatro dominios de unión a ligando, consistentes en repeticiones ricas en cisteína con homología al complemento, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático carboxi-terminal (Orlando y cols. 1997; Wicher y cols. 2006). Se trata de una proteína de 4.630 aminoácidos en su estado maduro, con una masa molecular de 519,636 KDa. Su topología plasmalémica consiste en una región extracelular de 4.398 aminoácidos, una región monotópica transmembranal de 23 aminoácidos y una región carboxi-terminal intracelular de 209 aminoácidos (Hjalm y cols. 1996; García y cols. 2007).

En su región extracelular se aprecian tres tipos de regiones ricas en cisteína constituidas así: la primera, con 36 residuos ordenados secuencialmente que garantizan el acople de las LDL, formando cuatro dominios de unión; la segunda, con 17 residuos con homología para ciertos factores de crecimiento, que a su vez están separadas entre sí por 8 residuos aminoacídicos espaciadores de tirosina-triptófano-treonina-ácido aspártico (YWTD); y la tercera, configurando un dominio proteico similar al factor de crecimiento epitelial (EGF-del inglés “Epithelial Growth Factor”) (Hjalm y cols. 1996).

Por su parte, su región intracelular contiene dos copias de la secuencia proteica fenilalanina-X-asparagina-prolina-X-tirosina ([F(X)NPXY]), encargada de mediar su internalización endocítica dependiente de clatrina. Debido a esta configuración, se sugiere que podría participar en determinadas cascadas de señalización o transducción de señales celulares, modulando posiblemente la actividad de segundos mensajeros intracelulares (Hjalm y cols. 1996; Herz y Book 2002; Nykjaer y Willnow 2002).

En el SNC, LRP2/megalina fue descrito por primera vez en los capilares cerebrales, en la capa endodermal de las paredes ventriculares y en los plexos coroideos (Kounnas y cols. 1994; Zheng y cols. 1994; Chun y cols. 1999). Posteriormente se describió su expresión en los progenitores neuronales de la médula espinal de embriones de ratón (Wicher y cols. 2005) y en oligodendrocitos de la medula espinal de embriones postnatales de ratones (Wicher y cols. 2006). También se ha descrito la expresión de LRP2/megalina en la superficie apical de células epiteliales de varios tejidos tales como, el epitelio del oído interno, neuroepitelio del tubo neural, epitelio de las vías respiratorias, epidídimo, tracto reproductor masculino y femenino, epitelio del seno endodérmico, saco vitelino, glomérulos, túbulos proximales renales, vellosidades intestinales y células foliculares del tiroides (Hjalm y cols. 1996; Moestrup y Verroust 2001; Yammani y cols. 2001; Christensen y Birn 2002; Van Praet y cols. 2003; Argraves y Morales 2004). Recientes estudios han ampliado la expresión de LRP2/megalina a otros tipos celulares, como astrocitos (Bento-Abreu y cols. 2008),

neuronas granulares del cerebelo (Ambjørn y cols. 2008) y neuronas sensoriales (Fleming y cols. 2009). La expresión de LRP2/megalina en neuronas había sido detectada por métodos inmunohistoquímicos en tejido obtenido de pacientes con EA (LaFerla y cols. 1997) aunque esta expresión no ha sido confirmada en otros estudios.

El papel mejor conocido de LRP2/megalina es el que ejerce en las células epiteliales del tubo proximal renal donde se encarga de la reabsorción de proteínas y vitaminas A y D (Willnow y cols. 1999) para el correcto funcionamiento fisiológico del riñón (Christensen y Birn 2002; Christensen y cols. 2009). En el cerebro, el LRP2/megalina participa en el aclaramiento de A β a través de la barrera sangre-LCR a nivel de los plexos coroideos (Zlokovic 1996; Zlokovic y cols. 1996; Hammad y cols. 1997; Carro y cols. 2005a) y la BHE (Zlokovic y cols. 1996; Hammad y cols. 1997; Deane y cols. 2004). Este mecanismo involucra la interacción del dominio extracelular de LRP2/megalina con varios transportadores conocidos de A β incluyendo ApoJ, ApoE, α 2M, albúmina y transtirretina (Christensen y Birn 2002; Carro y cols. 2005a; Nuutinen y cols. 2009), genes ya descritos como factores de riesgo de la EA. En este contexto, el papel de LRP2/megalina ha quedado probado en procesos neurológicos como la EA dada su habilidad para transportar estas proteínas y sus respectivos complejos con A β (Chun y cols. 1999). Además, recientemente se ha descrito que, a nivel de los plexos coroideos, se reduce la expresión de LRP2/megalina con la edad y en la EA (Carro y cols. 2005a; Dietrich y cols. 2008). También la funcionalidad de este receptor se ve reducida durante el desarrollo de la EA, de hecho el proceso de transcitosis, desde la membrana plasmática hacia el citosol, se altera disminuyendo el transporte de ligandos (Dietrich y cols. 2008), lo que representaría un importante factor de riesgo en la patogénesis de la EA. Otros ligandos conocidos de LRP2/megalina son la insulina (Orlando y cols. 1998), leptina (Dietrich y cols. 2008), o cubilina (Hammad y cols. 2000; Ahuja y cols. 2008).

Además de actuar como receptor para lipoproteínas, también puede unir varias sustancias, como fármacos, enzimas, hormonas, complejos vitamínicos con sus transportadores plasmáticos y proteínas transportadoras de A β como albúmina, ApoE y ApoJ entre otros (Moestrup y Verroust 2001; Christensen y Birn 2002; Carro y cols. 2005a; Andreassen 2006; Birn 2006; Dietrich y cols. 2008) (Figura18).

Figura 18: Ligandos de LRP2/megalina (en negrita proteínas relacionadas con la patología del A β) (Kounnas y cols.

Complejos transportadores de vitaminas	ApoB ApoE ApoJ/clusterina	Clq
Proteínas de unión a lípidos	ApoH/b2-glicoproteína-I ApoA PTH	Lactoferrina
Hormonas/Proteínas de unión a hormonas	Transtirretina Tiroglobulina	β 2-Microglobulina
Proteínas de unión a minerales	Leptina Insulina/ IGF-I Aminoglucósidos	EGF
Drogas	Polimixina B Aprotinina	Prolactina
Toxinas	Tricoxantina PAI-I	Lisozima
Enzimas e Inhibidores de enzimas	PAI-I-uriquinasa PAI-I-tPA Pro-uroquinasa	Citocromo C
Complejo TC-B12	Lipoproteína lipasa α -Amilasa	α 1-Microglobulina
Proteínas de unión a vitamina D Vitamina D	Albúmina RAP	PAP-I
Proteína de unión a retinol Vitamina A	Cadena ligera Ig Ca ²⁺	Proteína de unión a odorantes
		Proteína II de la vesícula seminal
		Otros

1993a; 1993b; Saito y cols. 1994; Hussain y cols. 1999; Moestrup y Verroust 2001; Christensen y Birn 2002; Carro y cols. 2005a; Andreassen 2006; Birn 2006; Dietrich y cols. 2008).

Se han atribuido varias funciones adicionales al LRP2/megalina en el SNC, al mediar en la transcitosis de factores de crecimiento como el IGF-I (Carro y cols. 2005a), el cual participa en varios procesos neuroprotectores en el cerebro descrito en modelos murinos para la EA (Carro y cols.

2001, Trejo y cols. 2001; Carro y cols. 2002), y al participar en la transcitosis de transtirretina, involucrada en la regeneración nerviosa neuronal (Fleming y cols. 2009) y en el aclaramiento de A β (Carro y cols. 2002). El LRP2/megalina también participa en el transporte de IGF-I al LCR a través de los plexos coroideos. Este hecho se comprobó mediante experimentos realizados con un ARN interferente (ARNi) del LRP2/megalina, en los que se observó que se producía un bloqueo en la entrada de IGF-I (Carro y cols. 2005a). En respuesta a estímulos como la exposición a ejercicio moderado durante un mes, se aprecia una mayor entrada de IGF-I al cerebro a través de la barrera sangre-LCR a nivel de los plexos coroideos, vía LRP2/megalina. Y, este evento se traduce en un incremento en el aclaramiento del péptido A β (Zlokovic y cols. 1996; Deane y cols. 2004; Carro y cols. 2005a).

También se han sugerido funciones en el desarrollo embrionario cerebral, al encontrarse severas deficiencias en el sistema nervioso en ratones deficientes del gen *LRP2/megalina*, los cuales mueren inmediatamente después del nacimiento (Willnow y cols. 1996; Marzolo y cols. 2003; Spoelgen y cols. 2005). Además, se han encontrado mutaciones genéticas en este gen asociadas a desórdenes neurodegenerativos como el síndrome de Donnai-Barrow (Kantarci y cols. 2007).

En resumen, este patrón de expresión de LRP2/megalina sugiere que puede cumplir un papel importante en la recuperación de moléculas a nivel renal, el desarrollo cerebral, el transporte a través de la BHE (Marzolo y cols. 2003), y en la absorción de moléculas y valiosos compuestos nutritivos como las vitaminas desde el intestino (García y cols. 2007).

3.1.2 LRP1 (LDL receptor-related protein-1)

Otro de los receptores que ha sido implicado en la toxicidad del A β es el receptor conocido como LRP1 (*Low density lipoprotein receptor-related protein-1*), receptor endocítico que se expresa ampliamente y de forma importante en el cerebro, hígado y pulmón. Dentro del cerebro se expresa en neuronas piramidales en regiones del hipocampo y la corteza, en astrocitos activados y microglía (Marzolo y cols. 2000).

Es una proteína altamente conservada en la escala filogenética, y está codificada por el cromosoma 12, localización 12q13.1-13.3. Las dos subunidades que componen este complejo corresponden a una cadena pesada de 515KDa y a una cadena ligera de 85KDa, las cuales derivan del procesamiento proteolítico a partir de un precursor formado por 4.544 aminoácidos y masa molecular de 600KDa. Se considera que una de las subunidades posee topología transmembrana y que la captación de su ligando es dependiente de calcio (Waldron y cols. 2008).

La función principal del LRP1 es la de captar y depurar ciertos catabolitos, con una mínima actividad de señalizador intracelular por sí mismo, aunque favorece el curso de ciertas cascadas intracelulares de segundos mensajeros. Además está involucrado en el transporte y metabolismo de lípidos (Waldron y cols. 2008).

En el cerebro, existen evidencias que indican que el LRP1 puede jugar un papel importante como receptor de A β (Marzolo y cols. 2000) funcionando como un mediador central en el mecanismo de aclaramiento de A β desde el cerebro hacia la sangre a nivel de la BHE y a lo largo del sistema cerebrovascular (Kounnas y cols. 1995; Narita y cols. 1997; Hyman y cols. 2000; Waldron y cols. 2008; Bell y Zlokovic 2009). De esta forma, LRP1 media en la endocitosis de complejos formados por varios de sus ligandos, como ApoE y α 2M, y su asociación con péptidos de A β (Ulery y Strickland 2000). Así, participa en la endocitosis y degradación de A β cerebral en la microglía y neuronas y mantiene el equilibrio de A β entre el SNC y la sangre (Waldron y cols. 2008). En este contexto, se ha observado que la unión de LRP1 con A β parece favorecer su internalización (Blacker y cols. 1998). En el caso de enfermedades neurodegenerativas como la EA, la producción de A β se incrementa de forma anormal, por lo que se supera la habilidad endocítica de LRP1, cuya expresión, a su vez, se ve suprimida en fases tempranas de la EA (Bell y Zlokovic 2009). De hecho, se observó en estudios experimentales que la densidad de placas seniles se alteraba significativamente como consecuencia de diferentes genotipos de LRP1 en tejido postmortem de enfermos de Alzheimer (Hussain y cols. 1991; Kang y cols. 1997). De modo interesante, el polimorfismo silencioso (C776T) en el exón 3 del gen *LRP1*, está asociado con riesgo para la EA de presentación senil. Este polimorfismo es una sustitución silenciosa del alelo C por T que no altera la

INTRODUCCIÓN

proteína, por lo que no está claro cómo afecta este polimorfismo en la función del LRP1 (Ulery y Strickland 2000).

Adicionalmente, LRP1 es capaz de mediar la endocitosis de APP por su dominio citoplásmico, y puede unir e internalizar tanto APP soluble, como una isoforma no procesada amiloidogénica, la cual a su vez puede llevar a la formación de A β (Knauer y cols. 1996; Cam y Bu 2006). Por lo tanto, puede estar influenciando el procesamiento de APP en múltiples pasos (Yoon y cols. 2005; Waldron y cols. 2008). De hecho, LRP1 incrementa la internalización de APP desde la superficie celular mediante una interacción indirecta con la proteína adaptadora FE65 (Kinoshita y cols. 2001; Pietrzik y cols. 2004; Waldron y cols. 2008). En ausencia de LRP1, la internalización de APP se reduce en un 50%, lo que también lleva a una reducción en la secreción de A β . Este descenso en la internalización del APP, incrementa la cantidad de APP disponible para la proteólisis de la α -secretasa en la superficie celular (Waldron y cols. 2008).

En la EA, el LRP1 juega un papel importante en el mecanismo de aclaramiento de A β (Kounnas y cols. 1995; Narita y cols. 1997; Hyman y cols. 2000; Waldron y cols. 2008). Se produce una alteración en la vía catabólica del A β por un descenso en los niveles de LRP1 en sitios donde se produce aclaramiento de A β (quizás neuronas o sitios a lo largo de la membrana capilar), mientras que la generación de A β puede estar aumentado por una regulación a la alta de LRP1 en glía activada encontrada en cerebros de EA (Ulery y Strickland 2000).

Además, LRP1 puede encontrarse en plasma como una forma soluble. El extremo N terminal del LRP1 puede sufrir un corte proteolítico en la superficie celular por la β -secretasa produciendo un dominio extracelular que corresponde al LRP soluble (sLRP). *In vitro*, A β se puede unir directamente al sLRP, y en humanos, el 70% del A β en plasma está asociado a sLRP. Además el sLRP puede ser responsable de eliminar A β de los capilares cerebrales. Se ha sugerido que sLRP en plasma humano actúa como un transportador de A β desde el cerebro a la sangre, y de aquí lo lleva hasta el hígado para su degradación. En pacientes con EA, sLRP está significativamente oxidado en plasma y no une A β eficientemente (Bell y Zlokovic 2009).

Por último, también se le han atribuido al LRP1 funciones en el neurodesarrollo. Al igual que LRP2/megalina, la relevancia de la función de esta proteína durante el desarrollo embrionario queda de manifiesto en modelos animales deficientes de LRP1, los cuales mueren durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario (May y cols. 2007).

3.2. PROTEÍNAS DE UNIÓN AL β -AMILOIDE

3.2.1. Gelsolina

La gelsolina es una proteína de unión a actina que tiene un papel regulador en el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina, componente fundamental del citoesqueleto de las células (Stossel 1990; Sun y cols. 1999). Es uno de los miembros más potentes de la superfamilia gelsolina/vilina que cortan los filamentos de actina con una eficiencia cercana al 100% (Sun y cols. 1999).

Se localiza intracelularmente en el citosol y la mitocondria (forma citoplasmática) (Stossel 1990) y extracelularmente como una proteína secretada en plasma y LCR (Kwiatkowski y cols. 1986; Kwiatkowski y cols. 1988; Kangas y cols. 1996; Wen y cols. 1996; Koya y cols. 2000).

La gelsolina citoplasmática parece regular la longitud de los filamentos de actina y su actividad está modulada por Ca^{2+} y fosoinositoles (Yin y Stossel 1979; Weeds 1982; Chauhan y cols. 1999).

Es una proteína monomérica de 82 KDa con 6 subdominios homólogos (S1-S6). Cada subdominio está compuesto por 5 láminas β , flanqueadas por dos hélices α (Kiselar y cols. 2003).

Tanto la forma secretada como la citoplasmática se originan por el splicing alternativo de un único gen de 70 Kb (que contiene al menos 14 exones) localizado en el cromosoma 9 (Kwiatkowski y cols. 1986). Ambas formas difieren en longitud y en estructura. La gelsolina secretada difiere de la forma citoplasmática en su extremo amino terminal, por poseer una extensión de 25 amino ácidos (Wen y cols. 1996).

Algunos estudios sugieren que la gelsolina difunde desde el suero al LCR (Paunio y cols. 1994), aunque otros creen que son los plexos coroideos los responsables de la presencia de gelsolina en el LCR (Matsumoto y cols. 2003).

Varios estudios han demostrado el papel anti-amiloidogénico de la gelsolina en la EA siendo capaz de reducir la carga de $\text{A}\beta$ (Chauhan y cols. 2008). Tanto la forma citoplasmática como la secretada, son capaces de unir $\text{A}\beta$ en condiciones fisiológicas, e inhibir la fibrilización y solubilizar las fibrillas preformadas de $\text{A}\beta$ (Chauhan y cols. 1999; Ray y cols. 2000; Chauhan y cols. 2008). Esta unión parece ser de manera concentración dependiente (Chauhan y cols. 1999).

La función de la gelsolina secretada en plasma y en el LCR es la de unir y secuestrar $\text{A}\beta$, manteniendo el $\text{A}\beta$ en forma soluble (Chauhan y cols. 1999; Chauhan y cols. 2008).

Ensayos de unión en fase sólida han mostrado 2 sitios de unión a $\text{A}\beta$ en la gelsolina con una constante de disociación de 1.38 y 2.55 mM (Chauhan y cols. 1999).

INTRODUCCIÓN

La gelsolina estaría involucrada en varias funciones relacionadas con la neurodegeneración en la EA. Estudios experimentales han demostrado que la administración de gelsolina reduce la carga de amiloide en modelos murinos de EA transgénicos para APP (Matsuoka y cols. 2003; Hirko y cols. 2007). También se ha visto que la expresión de gelsolina aumenta en las células en respuesta a estrés oxidativo (Chauhan y cols. 2008), por lo que se la considera como una proteína antioxidante y anti-apoptótica (Chauhan y cols. 2008). La gelsolina citoplasmática es capaz de inhibir la apoptosis al inhibir los cambios mitocondriales apoptóticos vía pérdida de potencial de membrana y liberación de citocromo C (Koya y cols. 2000; Qiao y cols. 2005). Antes de producirse la muerte celular, la mitocondria normalmente pierde el potencial de membrana y se vuelve más permeable. La gelsolina citoplasmática puede impedir la liberación de citocromo C, obstruyendo así la amplificación de señal que llevaría a la apoptosis, siendo el segmento 5 de la gelsolina humana citoplasmática suficiente para esta función (Qiao y cols. 2005).

Varios estudios han sugerido que además de las funciones ya descritas de la gelsolina, ésta tiene un papel en la modulación de los canales de Ca^{2+} y de los receptores NMDA (Furukawa y cols. 1997). Hay que señalar que mutaciones en la gelsolina hacen que ésta sea amiloidogénica por sí misma. La amiloidosis relacionada con la gelsolina es una rara polineuropatía amiloide hereditaria, resultante de la mutación Asp187Asn o Asp187Tyr en el gen *GSN* (De la Chapelle y cols. 1992; Kangas y cols. 1996). Estas mutaciones producen una digestión intracelular anormal de la gelsolina secretada entre los residuos 172 y 173 que llevan a la producción de un fragmento amiloidogénico (desde el residuo 173 al 243) (Maury y cols. 1997). Sin embargo, la gelsolina no mutada juega diferentes papeles en la EA. Como ya se ha expuesto anteriormente, pueden prevenir o retrasar la progresión de la EA por secuestro, inhibición de la fibrilización y reducción de la carga de $\text{A}\beta$ (Chauhan y cols. 1999).

3.2.2. Transtirretina

La transtirretina es una proteína homotetramérica de 55 KDa con una configuración de dímero de dímeros que es sintetizada principalmente en el hígado.

Dentro del SNC, es la única proteína conocida que únicamente es sintetizada por los plexos coroideos (Herbert y cols. 1986; Ando y cols. 1995). Aproximadamente el 25% del total de proteína sintetizada por los plexos se corresponde a transtirretina (Palha y cols. 1996), y representa el 5% de las proteínas del LCR (Serot y cols. 2003).

Se encuentra en plasma y LCR y se compone de cuatro monómeros, representando cada uno un polipéptido idéntico de 127 residuos rico en estructuras de láminas β (Guevara y cols. 2003).

Juega un importante papel fisiológico en la unión y transporte de la hormona tiroxina (T4) y como transportador de retinol (vitamina A) a través de asociación con la proteína de unión a retinol (Alves y cols. 1997).

La transtirretina es una proteína polimórfica que está codificada por un único gen localizado en el cromosoma 18, y la mayor parte de la región codificante (más del 97%) está constituida por 3 (exón 2, 3 y 4) de los 4 exones que forman el gen, cada uno de 200 pares de bases aproximadamente (Moses y cols. 1990; Torres y cols. 1995).

Ensayos *in vitro* demostraron que la transtirretina también es capaz de unir A β (Buxbaum y cols. 2008), y que una expresión incrementada de transtirretina en el cerebro parece detener la progresión de la EA (Stein y cols. 2004). Desde entonces, se sugirió que la transtirretina podría prevenir la interacción de los fragmentos tóxicos de A β con las células neuronales, previniendo de este modo la formación de los ovillos neurofibrilares y la consecuente muerte de células neuronales.

Otros autores también sugieren que la transtirretina une A β de manera que previene la fibrillogénesis (Schwarzman y cols. 1994), la formación de placas y la toxicidad, presumiblemente por interferir con la agregación de los fragmento de A β que con más probabilidad se unen entre sí, y causan déficits neurológicos y de comportamiento en modelos murinos de EA (Merched y cols. 1998; Qiao y cols. 2005; Buxbaum y cols. 2008). Estos hechos pueden también producirse en el cerebro humano. Puede ser que la formación de placas en cerebro humano solo se produzca cuando haya una insuficiente cantidad de transtirretina capaz de inhibir la agregación, como es en la vejez (Buxbaum y cols. 2008). De hecho, se ha sugerido que tanto el ApoE como la transtirretina son principalmente, las dos proteínas más importantes con la función de promover la solubilización, transporte y aclaramiento de A β en el LCR (Merched y cols. 1998), y en el caso de la transtirretina probablemente vía LRP2/megalina (Carro y cols. 2005a).

También hay evidencias de que los niveles de transtirretina en LCR están significativamente reducidos en pacientes con EA comparados con controles e inversamente correlacionados con la abundancia de placas seniles, mientras que los niveles de ApoE en LCR lumbar se encuentran incrementados en casos con un envejecimiento normal y más acusadamente en la EA (Merched y cols. 1998). Por lo tanto la transtirretina en LCR lumbar parece estar correlacionada inversamente con el grado de demencia en pacientes con EA (Merched y cols. 1998; Hansson y cols. 2009). Este descenso en los niveles de transtirretina en LCR observado en pacientes con EA puede reflejar un descenso en la síntesis de esta proteína por los plexos coroideos, como se ha visto recientemente (Dietrich y cols. 2008), posiblemente como consecuencia de la acción del A β (Chen y cols. 2005).

Varios científicos sugieren que la transtirretina podría representar una potente defensa natural contra el desarrollo de la EA en humanos, una defensa que como ya se ha comentado, disminuye con esta enfermedad. De esta manera una terapia basada en la transtirretina podría tratar o prevenir la enfermedad, como se ha sugerido recientemente (Buxbaum y cols. 2008).

Al sugerirse que la transtirretina podría tener la función de secuestrar A β en el LCR previniendo así la deposición de A β y la consecuente formación de placas, es razonable pensar que mutaciones en el gen *TTR* o cambios conformacionales en la proteína inducidos por la edad, podrían alterar las propiedades de secuestro de A β por parte de la transtirretina (Palha y cols. 1996).

Hay más de 50 mutaciones diferentes descritas en el gen *TTR* asociadas con la deposición de amiloide, aunque como ya se ha comentado, dicha deposición se puede producir también en ausencia de mutaciones (Vidal y cols. 1996; Alves y cols. 1997; Guevara y cols. 2003).

Varias mutaciones se han descrito en el gen *TTR*, la mayoría de estas, relacionadas con la polineuropatía amiloide familiar caracterizada por deposiciones de fibrillas de amiloide en varios tejidos, particularmente en el sistema nervioso periférico. Algunas de estas mutaciones se han usado para evaluar la unión a LRP2/megalina, puesto que la estructura de la transtirretina parece ser importante en la unión a dicho receptor. Estudios de aclaramiento comparativo mostraron que la transtirretina con la mutación V30M tenían un aclaramiento más rápido que el de la transtirretina con la mutación T119M. Se ha especulado que uno de los factores que podrían estar involucrados en la existencia de diferencias en el aclaramiento podría ser la presencia de receptores celulares para la transtirretina con diferentes afinidades para las dos formas mutantes de la proteína, lo que se demostró en el caso de LRP2/megalina (Sousa y cols. 2000).

3.3. IGF-1

El IGF-I (factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I) es una hormona proteica polipeptídica de cadena única con tres enlaces disulfuro intramoleculares. Tiene una estructura molecular homóloga a la de la insulina y el IGF-II, todos ellos pertenecientes a la familia de los factores de crecimiento de tipo insulina (Baxter y cols. 1989; Daughaday y Rotwein 1989).

El gen *IGF-I* está localizado en el brazo largo del cromosoma 12, localización 12q23–23 y está formado por 6 exones (Brissenden y cols. 1984; Mullis y cols. 1991). La proteína consiste en 70 residuos de aminoácidos con una masa molecular de 7649 daltons. Circula principalmente en forma de complejo terciario, de peso molecular alto (140000 daltons), unida a las proteínas transportadoras del IGF-I y a una subunidad ácida lábil, lo que estabiliza la molécula e incrementa

su vida media. Aproximadamente el 98-99% del IGF-I circula en sangre (con una vida media de unas 18 horas) unido a una de sus 6 proteínas transportadoras de factor del crecimiento de tipo insulina (IGFBPs). La IGFBP3 es la proteína de unión a IGF-I más abundante en plasma, por lo que transporta aproximadamente el 80-90% de todo el IGF-I, formando un complejo que limita el paso del IGF-I de la sangre a los tejidos (Baxter y cols. 1989). El resto viaja libre con una vida media de unos 20 minutos (Laron 2001). Dentro del sistema nervioso adulto, tanto en cerebro como en LCR, la proteína de unión a IGF-I más abundante es la IGFBP2 (Ocrant y cols. 1990).

La mayor parte de la síntesis de IGF-I se produce en el hígado, regulado por la hormona de crecimiento (GH) a través del eje somatotrópico (Carro y cols. 2006a). Sin embargo, existen otros tejidos capaces de sintetizar IGF-I de manera local e independiente de la regulación de GH entre los que se incluyen riñón, placenta, corazón, pulmón, páncreas, bazo, intestino delgado, intestino grueso, testículos, ovarios, médula ósea, hipófisis y cerebro, siendo éste último uno de los tejidos diana más importantes del IGF-I.

Hasta el momento se han descrito cuatro tipos de receptores para esta familia de péptidos, todos ellos localizados en la superficie celular: receptor de IGF-I, receptor de IGF-II, receptor de insulina y receptor híbrido de insulina e IGF-I. Todos estos receptores están relacionados estructuralmente, aunque es el receptor de IGF-I el principal mediador de las acciones de IGF-I.

Para realizar sus funciones biológicas, el IGF-I se une a su receptor celular específico, que se expresa en la superficie de la membrana celular y pertenece a la familia de los receptores tirosina-quinasa (Gronborg y cols. 1993).

Se sabe, que tanto la BHE como la barrera sangre-LCR formada por los plexos coroideos expresan una gran cantidad de receptores de IGF-I (Araujo y cols. 1989; Aguado y cols. 1993), cuya expresión disminuye en cerebros con EA con diferentes estadios de severidad según Braak & Braak (Rivera y cols. 2005). Además de los receptores clásicos de IGF-I, se ha demostrado que, al igual que la insulina (Orlando y cols. 1998), el IGF-I es capaz de unirse a LRP2/megalina regulando así su entrada al cerebro (Carro y cols. 2005a).

El IGF-I juega un papel importante en el crecimiento infantil y continúa teniendo un efecto anabolizante en adultos. Los niveles de IGF-I en humanos son prácticamente indetectables en el momento del nacimiento, se elevan de manera gradual durante la infancia, llegan al máximo en la mitad de la adolescencia hasta aproximadamente los 40 años de edad y después se reducen de manera gradual (Hall y Sara 2006).

El IGF-I sintetizado dentro del sistema nervioso ha sido relacionado con neuroprotección tras lesiones cerebrales, ya que la actividad del IGF-I y de IGFBPs aumenta tras accidentes isquémicos (Hwang y cols. 2004) y contusiones (Nordqvist y Petersson 1996) y, en todos los casos su expresión

aumenta en la zona circundante a la lesión (Russo y cols. 2005). Se ha observado que la administración de IGF-I *in vivo* reduce el área de infarto producida por isquemia-hipoxia (Liu y cols. 2001; García-Galloway y cols. 2003; Brywe y cols. 2005) o revierte y previene el desarrollo de ataxia cerebelosa (Fernández y cols. 1999; Zhong y cols. 2005). Por otro lado, es capaz de modular la astrogliosis en respuesta al daño cerebral (Fernández y cols. 1997; Pons y Torres-Alemán 2000; Carro y cols. 2006b; Fernández y cols. 2007).

De la misma forma, el IGF-I producido dentro del sistema nervioso ha sido relacionado con la modulación de la neurogénesis en el bulbo olfatorio (Vicario-Abejón y cols. 2003), así como en la arborización de las espinas dendríticas (Llorens-Martin y cols. 2009).

El IGF-I circulante (mayoritariamente producido por el hígado) está implicado en funciones cerebrales y en el desarrollo del sistema nervioso, ya que animales transgénicos deficientes en la producción de IGF-I en el hígado (ratones LID), presentan complicaciones neurológicas (Liu y cols. 1993) y poseen una disminución en el tamaño del cerebro como consecuencia de la pérdida de oligodendrocitos, axones, y determinadas subpoblaciones neuronales, tales como neuronas granulares (Vicario-Abejón y cols. 2003), interneuronas (Edmondson y cols. 1995) y neuronas auditivas (Varela-Nieto y cols. 2004; Rodríguez y cols. 2007) en distintas zonas del cerebro.

El fenotipo de los animales LID pone de manifiesto la importancia del transporte del IGF-I circulante en suero al cerebro a través de la BHE. El IGF-I derivado de la sangre está presente en todas las áreas del cerebro, y teniendo en cuenta que la producción del mismo dentro del sistema nervioso adulto es muy baja (Bach y cols. 1991), y que su receptor se expresa ampliamente con un patrón de expresión que no coincide con el de IGF-I, se deduce que la mayor parte del IGF-I presente en el sistema nervioso adulto podría tener un origen periférico (Sonntag y cols. 1999; Carro y cols. 2006a).

Así parece que la periferia y el sistema nervioso central se encuentran en constante intercambio de IGF-I. Además se ha demostrado que la entrada de IGF-I circulante al cerebro se incrementa en respuesta a estímulos fisiológicos tales como el ejercicio físico y es responsable de muchos de los efectos neuroprotectores de éste (Carro y cols. 2001).

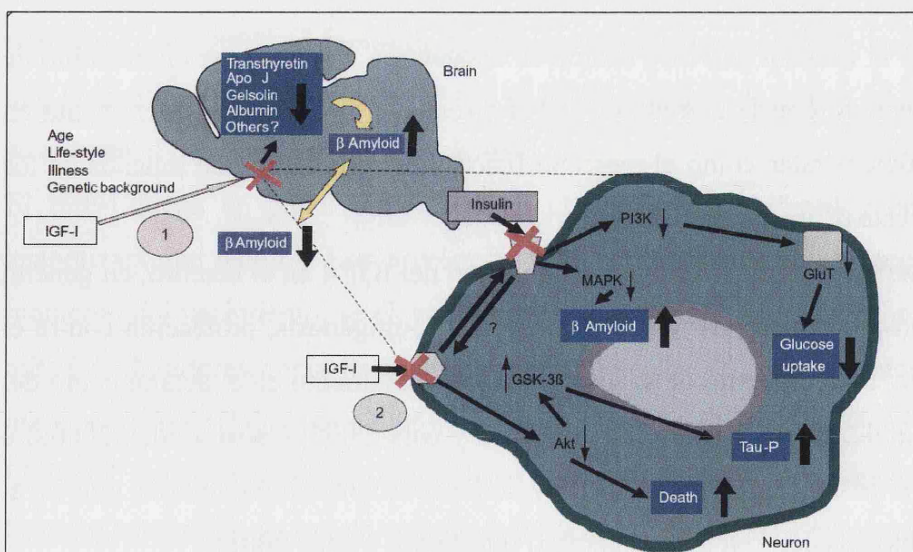
Son muchos los efectos beneficiosos que se derivan de la acción del IGF-I en el cerebro, en general efectos neurotróficos y neuroprotectores, así como aumento de neurogénesis, protección contra el daño cerebral, incremento en el crecimiento de vasos cerebrales, incremento en el aclaramiento del A β cerebral (Carro y cols. 2002; Carro y cols. 2005b; Russo y cols. 2005; Carro y cols. 2006a) e inhibición de la fosforilación de tau (Hong y Lee 1997) y de las reacciones inflamatorias gliales, al contrarrestar los efectos deletéreos del TNF α en el cerebro (Gasparini y cols. 2003).

El IGF-I como factor neurotrófico, actúa como factor de supervivencia neuronal inhibiendo apoptosis (Dudek y cols. 1997; Chrysis y cols. 2001; Dávila y Torres Alemán 2008).

Además, se encuentra implicado en importantes aspectos de la función cerebral (Trejo y cols. 2004), y en la modulación de la potenciación sináptica de los circuitos del hipocampo, de este modo, afectando en el aprendizaje y la memoria (Trejo y cols. 2007). Entre sus efectos, se incluyen la regulación en la liberación de neurotransmisores (Seto y cols. 2002), la modulación de los canales iónicos (Blair y Marshall 1997), la excitabilidad neuronal (Núñez y cols. 2003), sinaptogénesis (O'Kusky y cols. 2003), neurogénesis hipocámpal del adulto (Trejo y Llorens-Martín 2008) y protección frente a la toxicidad de A β (Carro y Torres-Alemán 2004).

También se ha demostrado que el bloqueo de la entrada de IGF-I al cerebro es suficiente para generar una patología similar al Alzheimer en modelos animales de EA, al observarse incremento en los niveles de proteína tau hiperfosforilada y deterioro cognitivo en el cerebro de estos modelos animales (Carro y cols. 2005b; Carro y cols. 2006b). El tratamiento con IGF-I sistémico disminuye la amiloidosis y mejora el deterioro cognitivo en estos modelos animales (Carro y Torres-Alemán 2004). Se puede concluir que la interrupción de la entrada de IGF-I al cerebro, origina tanto alteraciones a nivel tisular, reduciendo el aclaramiento de A β , contribuyendo así a la acumulación cerebral de A β (Carro y Torres-Alemán 2004; Carro y cols. 2006b) como a nivel celular, incluyendo baja resistencia neuronal a la toxicidad por A β , incremento en la susceptibilidad a otras señales de muerte celular, hiperfosforilación de tau y resistencia a la insulina (Figura 19).

Figura 19: Doble papel del IGF-I en el desarrollo de la EA. 1-Modulación del proceso de aclaramiento de A β : se puede producir un descenso en los niveles de IGF-I a nivel de los plexos coroideos y en los vasos sanguíneos debido a la edad, ciertas enfermedades, estilo de vida, o por herencia genética. A consecuencia de esto, se acumula A β en el cerebro al disminuir el aclaramiento



disminuir el aclaramiento mediado por las proteínas transportadoras, que están moduladas por IGF-I. 2-Modulación de procesos de apoptosis/supervivencia: la amiloidosis cerebral puede llevar a la disfunción de IGF-I /Insulina, lo que origina una reducción en la activación de MAPK y PI3K, lo que a su vez, provoca una disminución del aclaramiento

de A β , reducción de la traslocación del transportador de glucosa, incremento de muerte celular e incremento de tau hiperfosforilado (Carro y Torres-Alemán 2004).

Sumando todas estas evidencias, se podría pensar que el tratamiento con IGF-I podría prevenir la aparición de las deficiencias cognitivas asociadas a la EA, como se ha visto en modelos animales (Carro y cols. 2002; Carro y cols. 2005b).

Probablemente la EA sea la mejor demostración existente entre la alteración de los niveles de IGF-I circulante en humanos y el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa, aunque existen controversias entre si los niveles de IGF-I en suero aumentan o disminuyen en pacientes con EA comparado con controles. Mientras que diversos trabajos han evidenciado una reducción en los niveles de IGF-I en suero en pacientes con EA comparado con controles de la misma edad (Mustafa y cols. 1999; Murialdo y cols. 2001; Álvarez y cols. 2007), otros estudios han descrito una relación inversa (Tham y cols. 1993; Vardy y cols. 2007; Salehi y cols. 2008).

Tanto el descenso como el incremento de los niveles de IGF-I en suero, pueden conllevar una reducción de la entrada de IGF-I a las células diana. La deficiencia de IGF-I sérico resultaría en el descenso en la entrada de éste a las células diana, mientras que altos niveles de IGF-I sérico podrían reflejar tanto un mecanismo de resistencia a IGF-I a través del cual, las células diana pierden sensibilidad a la señalización de IGF-I, como un aumento en la demanda de los efectos neuroprotectores del IGF-I en el cerebro de pacientes con EA.

De cualquier forma, los pacientes con EA muestran cambios en los niveles séricos de IGF-1 comparados con controles de la misma edad y su respuesta al IGF-I es defectuosa (De la Monte y Wands 2005). A nivel cerebral, se ha observado en análisis post-mortem de pacientes con EA, que se produce una significativa reducción tanto en los niveles de IGF-I, como de su receptor (De la Monte 2009). El déficit de esta hormona en el cerebro podría contribuir a la degeneración de las neuronas, un primer signo de esta enfermedad (De la Monte y Wands 2005).

OBJETIVOS

Para este estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudio de mecanismos patológicos implicados en el transporte de A β a través de la barrera que separa la sangre del LCR a nivel de los plexos coroideos:
 - 1.1. Estudiar alteraciones relacionadas con supervivencia celular
 - 1.2. Estudiar alteraciones estructurales
2. Estudio de genes candidatos, relacionados con el proceso de aclaramiento del A β a nivel de los plexos coroideos, como posibles factores de riesgo de la EA:
 - 2.1. Desarrollar estudios de asociación genética en el gen *LRP2/Megalina* (receptor de A β)
 - 2.2. Desarrollar estudios de asociación genética en los genes *GSN* y *TTR* (proteínas de unión a A β)
 - 2.3. Desarrollar estudios de asociación genética en el gen *IGF-I* (factor neurotrófico regulador del transporte del A β y sus ligandos)

RESULTADOS

1. ALTERACIONES PATOLÓGICAS ASOCIADAS AL PROCESO DE ACLARAMIENTO DEL β -AMILOIDE A NIVEL DE LOS PLEXOS COROIDEOS

1.1. Alteraciones relacionadas con supervivencia celular

[REDACTED]: Vargas T*, Ugalde C*, Spuch C, Antequera D, Morán MJ, Martín MA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E. “*Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis*”. Neurobiol Aging. 2008 Oct 4. [Epub ahead of print]. *These authors have contributed equally to this work

Resumen

Uno de los posibles mecanismos involucrados en el daño neuronal inducido por A β es la alteración en la barrera sangre-LCR. Recientemente hemos demostrado que los pacientes con EA presentan una acumulación de A β en los plexos coroideos, lo que podría alterar las funciones fisiológicas del epitelio de los plexos coroideos. En este estudio se investigan si estas alteraciones están mediadas por la disfunción mitocondrial, un mecanismo patológico que se produce en etapas tempranas de la EA a nivel neuronal. Nuestras principales observaciones fueron: confirmación de la acumulación de A β ; niveles incrementados de óxido nítrico; disfunción de la actividad y ensamblaje de los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial; y un incremento significativo de especies reactivas de oxígeno y de la expresión de caspasas en las células epiteliales de los plexos coroideos. Nuestros resultados también demuestran una relación directa entre la toxicidad de A β , el incremento en la expresión de MMP-9, y la alteración de la barrera sangre-LCR. Por lo tanto, hemos propuesto una secuencia de pasos con alteraciones patológicas que conectan la acumulación de A β en el epitelio de los plexos coroideos con un incremento en la producción de óxido nítrico, disfunción mitocondrial y sobre-expresión de MMP-9, lo que lleva en último término a la muerte celular, y probablemente a la disfunción de la barrera sangre-LCR.



A β accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis

Teo Vargas^{a,b,1}, Cristina Ugalde^{c,d,1}, Carlos Spuch^{a,b},
Desiree Antequera^{a,b}, María J. Morán^{c,d}, Miguel A. Martín^{c,d},
Isidro Ferrer^{b,e}, Felix Bermejo-Pareja^{b,f}, Eva Carro^{a,b,*}

^a Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^b Neurodegenerative Diseases Biomedical Research Center (CIBERNED), Madrid, Spain

^c Mitochondrial Diseases Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^d Rare Disorders Biomedical Research Center (CIBERER), Madrid, Spain

^e Neuropathology Institute, Anatomopathology Service IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, Spain

^f Neurology Service, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

Received 12 May 2008; received in revised form 5 August 2008; accepted 24 August 2008

Abstract

One of the possible mechanisms involved in β -amyloid (A β)-induced neuronal damage is blood–cerebrospinal fluid barrier dysfunction. Recently, we have demonstrated that Alzheimer patients have an elevated expression of A β in the choroid plexus (CP), where it could impair the physiological functions of CP epithelium. We investigated whether these alterations were mediated by mitochondrial dysfunction, a common early pathomechanism in Alzheimer's disease. Our main observations were: high A β levels; increased nitric oxide levels; impairment of the activity and assembly of mitochondrial respiratory chain complexes I and IV; and a significant increase in reactive oxygen species and caspase expression in CP epithelial cells treated with A β . Our results also demonstrate a direct relationship between A β toxicity, increased expression of matrix metalloproteinase-9, and blood–cerebrospinal fluid barrier disruption. We propose a sequence of pathological steps that link A β accumulation in CP epithelium with an enhanced nitric oxide production, mitochondrial dysfunction, and up-regulation of matrix metalloproteinase-9, which ultimately lead to cell death, and probably to CSF barrier dysfunction.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Choroid plexus; Alzheimer's disease; Cell death; Mitochondria; Nitric oxide; β -amyloid; Reactive oxygen species

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent neurodegenerative disorder. It is clinically characterized by progressive memory loss and cognitive function deterioration. Anatomically, the main pathological features of AD are massive neuronal loss, presence of intracellular tangles, and extracellular senile plaque deposition, whose major con-

stituent is β -amyloid (A β) (Selkoe, 2000). In individuals with AD, A β also accumulates in cerebrovascular walls, where it induces blood–brain barrier (BBB) disruption (Kalaria, 1999; Miyakawa et al., 2000; Deane and Zlokovic, 2007) and apoptosis-like death of endothelial cells (Blanc et al., 1997; Xu et al., 2001; Yin et al., 2002). Indeed, a large body of evidence indicates that the toxic effect of A β involves activation of apoptosis pathways (Loo et al., 1993; Estus et al., 1997; Yao et al., 2005; Yin et al., 2006); however, the specific signaling pathway mediating this A β -induced cellular death has not been completely elucidated.

Besides accumulating in parenchyma and blood vessels, A β also accumulates in choroid plexus (CP) epithelium, a primary component of the blood–cerebrospinal fluid (CSF)

* Corresponding author at: Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Avda de Córdoba s/n, 28041 Madrid, Spain.
Tel.: +34 913908765; fax: +34 913908544.

E-mail address: carroeva@yahoo.es (E. Carro).

¹ These authors have contributed equally to this work.

barrier (Dietrich et al., 2008). At the CSF barrier, CP plays a critical role in the support of neuronal function by clearing A β (Carro et al., 2002; Zlokovic, 2004), which becomes altered by A β accumulation. Recent results from our laboratory suggest a direct relationship between A β deposits at CP epithelium and the development of a functional and structural dysfunction (Dietrich et al., 2008). However, the precise role and mechanism of A β toxicity in these cells remains unknown.

Several studies have suggested that A β neurotoxicity seems to be mediated by oxidative stress, probably leading to mitochondrial damage with loss of respiratory chain complexes activity (Bosetti et al., 2002; Casley et al., 2002; Devi et al., 2006; Fukui et al., 2007). Also, A β impairs nitric oxide (NO) generation in neurons (Keil et al., 2004) and endothelial cells (Luth et al., 2001; Suhara et al., 2003). NO is a signaling molecule that regulates many biological processes in the nervous system, including apoptosis (Melino et al., 1997; Baud et al., 2004; Figueroa et al., 2006). NO is known to inhibit mitochondrial respiration (Brown and Borutaite, 2002) and increase expression and activity of metalloproteinase (MMP)-9 (Gu et al., 2002). MMPs are one of the most important stress and excitotoxicity mediators involved in BBB disruption (Rosenberg et al., 1998; Gasche et al., 2001). MMPs constitute a family of extracellular soluble or membrane-bound proteases that are involved in extracellular matrix remodeling in normal and pathological conditions (Werb, 1997; Nagase and Woessner, 1999). In particular, MMP-9 has the capacity of digesting the endothelial basal lamina, leading to BBB disruption (Rosenberg et al., 1998; Lee et al., 2003).

On the basis of these findings, we decided to investigate the precise mechanisms underlying A β role on cell survival and functionality of the CP barrier by means of several experimental approaches mimicking different situations encountered in AD: A β -treated CP epithelial cells obtained from AD subjects and the AD amyloidosis APP/PS1 (amyloid precursor protein/presenilin-1) transgenic mice model.

2. Methods

2.1. Animals

Young (3–5 months) Wistar rats were from our inbred colony. Double-transgenic APP/PS1 mice (12 months of age), a cross of the Tg2576 (overexpressing human APP695) and mutant PS1 (M146L) mice, were used as a model of AD amyloidosis. Non-transgenic littermates were used as controls. All animals were handled and cared for in accordance with European Economic Community guidelines. Human analog peptides corresponding to A β _{1–42} (5 μ g/rat; Anaspec, Inc., San Jose, CA) was stereotactically injected in each lateral ventricle (1 posterior from bregma, 1.2 lateral, and 4 mm ventral) with a 10 μ l Hamilton syringe at 1 μ l/min. A β _{1–42}

Table 1
Neuropathological rating in AD patients

	Braak stage	Neuritic plaque burden
AD patient (male)	II, III, and IV	8.4 \pm 1.8%
AD patient (female)	I and III	10.2 \pm 3.2%

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Male AD patients, n = 4. Female AD patients, n = 2.

was previously dissolved in acetic acid 0.1 M, and then was diluted in sterile distilled water according to previously described (Carro et al., 2002; Dietrich et al., 2008), and manufacturer's instructions. Animals were perfused transcardially either with saline buffer – for biochemical analysis – or 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) – for immunohistochemical analysis.

2.2. Human samples

Subjects were selected on the basis of post-mortem diagnosis of AD according to the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) criteria (Mirra et al., 1994). Two groups of human brain samples were used in this study: (1) AD patients, consisting of four men and two women (mean age 68.33 \pm 4.35 years; Braak stages I, II, III, and IV) (Braak and Braak, 1991); and (2) aged control group, consisting of three men and three women without neurological disease or cognitive impairment (mean age 60.5 \pm 5.22 years). Human brain tissue (7 \pm 1.1 h time post-mortem) was obtained from the Neuropathology Institute, Anatomopathology Service, IDIBELL-Hospital "Universitario de Bellvitge" (Barcelona, Spain). Pieces of cerebral cortex and CP were cut from the frozen brains and divided in two portions. The portion used for biochemical analysis was solubilized in a buffer containing NP-40, followed by a buffer containing 2% SDS; the other portion was processed for immunohistochemical analysis. Neuropathological characteristics of these AD patients samples have been included in the Table 1.

2.3. Cell culture

Epithelial cell monolayers from P3 to P5 Wistar rats were prepared as described by Carro et al. (2002). Cells were grown to confluence for 5–7 days and serum starved for 2 h, then, human analog peptides corresponding to A β _{1–40}, A β _{1–42} or scrambled A β _{1–42} (5 μ g/ml; AnaSpec, Inc., San Jose, CA) were added. A β _{1–40} and A β _{1–42} were previously dissolved in acetic acid 0.1 M, and then were dissolved in sterile distilled water as reported by Dietrich et al. (2008). At different times after stimulation, cells were either fixed for immunocytochemical processing or homogenized for immunoblot determination. In a double-chamber CP epithelial cell culture system, permeability was assessed by means of a diffusion assay using (¹⁴C)-carboxylated inulin (Amersham) as a paracellular marker, as previously described (Carro et al., 2002).

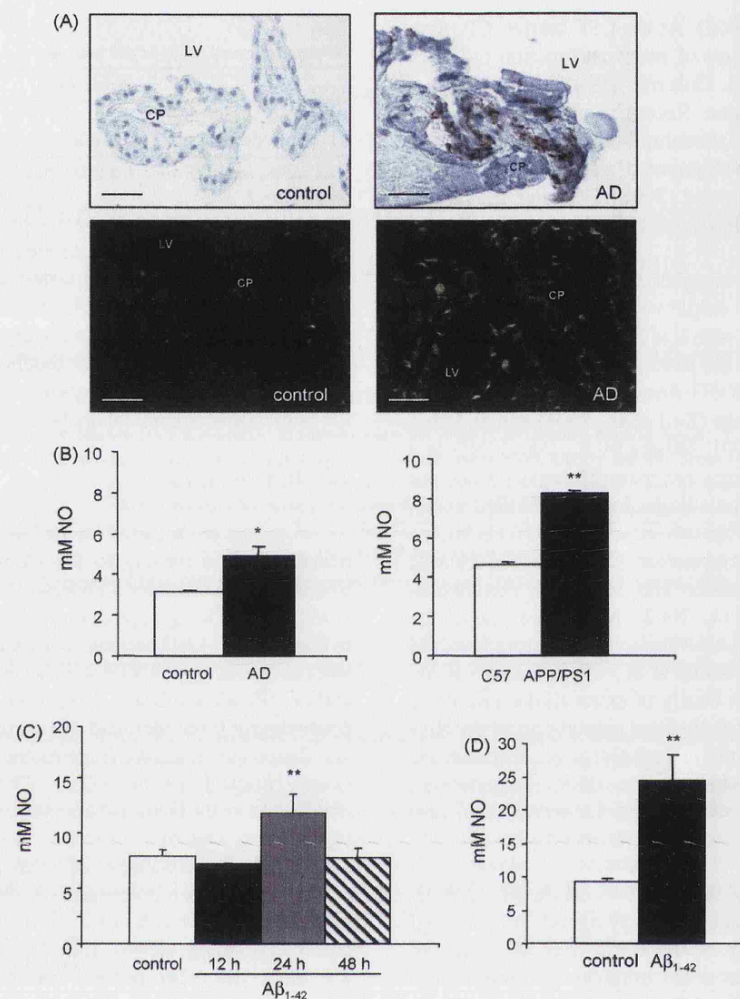


Fig. 1. Quantification of NO production and cell death in CP from AD patients and APP/PS1 mice. (A) Aβ deposits were detected in CP from AD patients using a human-specific antibody (top panel), and with thioflavin staining (bottom panel). Aβ deposits were not detected in control subjects. Magnification: 40× (CP, choroid plexus; LV, lateral ventricle; $n = 5$ per group). Scale bar = 20 μm. (B) Basal NO production is increased in CP from AD patients and APP/PS1 mice ($n = 5-6$ per group); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus respective controls. (C) *In vivo*, NO production is enhanced in CP after intracerebroventricular Aβ₁₋₄₂ administration. Maximal effect was observed 24 h after treatment ($n = 4$ per group); ** $p < 0.01$ versus vehicle-injected rats. (D) CP epithelial cells treated with Aβ₁₋₄₂ for 24 h exhibit a significantly enhanced NO production compared with untreated cells ($n = 3$); ** $p < 0.01$ versus untreated cells.

2.4. Immunoassays

Western blot (WB) analysis was done according to the method described by Carro et al. (2002). For Aβ deposits detection, brain sections from AD subjects, and APP/PS1 mice were pre-incubated in 88% formic acid and immunostained using a human-specific antibody to Aβ (6E10; Sigma) as described by Carro et al. (2002). Amyloid deposits were also evaluated with thioflavin-S, as described by Carro et al. (2005). The following antibodies were used: anti-Aβ₁₋₄₀ (Chemicon), anti-Aβ₁₋₄₂ (Chemicon), anti-MMP-9 (Chemicon), anti-ZO-1 (Santa

Cruz, CA), anti-β-actin (Sigma-Aldrich), anti-megalin (Santa Cruz), anti-caspase 3 and anti-caspase 9 (Cell Signaling), and antibodies anti-α30, anti-α70, anti-Core II, and anti-Cox Va (Molecular Probes, Invitrogen). Secondary antibodies used were either fluorescent (Alexa Fluor; Molecular Probes, Invitrogen) or HRP-conjugated (Bio-Rad).

2.5. Blue Native electrophoresis

Mitochondrial membranes were isolated from primary cultures according to the method described by Nijtmans

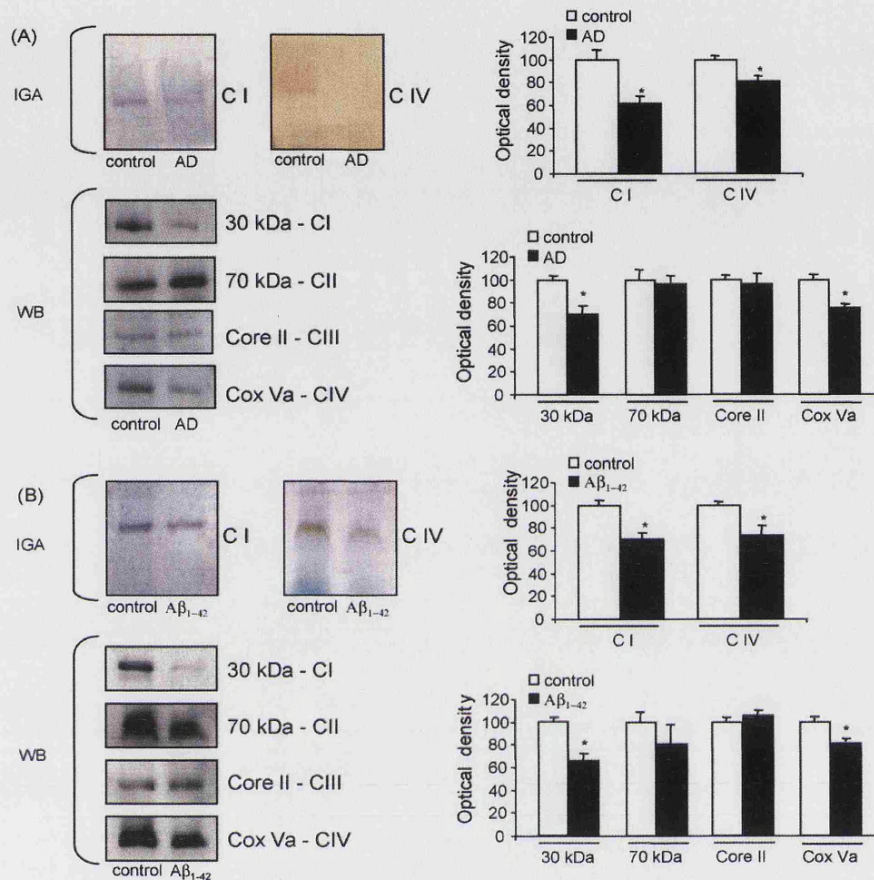


Fig. 2. Characterization of mitochondrial respiratory chain activity in CP. *In-gel* complexes I and IV activity (IGA) assays of CP samples from AD patients, and CP epithelial cells were performed on a BN-PAGE gel. (A) Activities of complexes I and IV were significantly reduced in CP from 12-month-old APP/PS1 mice (top panel). Representative WB of these tissue samples were incubated with antibodies directed against representative respiratory chain subunits, and showed reduced levels of complexes I and IV (bottom panel) ($n=5$); $*p<0.05$. (B) CP epithelial cells treated with Aβ₁₋₄₂ for 48 h showed a similar decrease in mitochondrial activity and complexes I and IV levels (top panels) (n of at least 3); $*p<0.05$. Representative blots and quantitative histograms are shown.

et al. (2002). Briefly, choroid plexus epithelial cells were cultured until cells were approximately 90% confluent. The cells were harvested using trypsin, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in 100 μl PBS plus 100 μl digitonin solution (4 mg/ml). This cell solution was kept on ice for 10 min in order to dissolve the membranes. One milliliter of cold PBS was added to the cells which were then spun for 10 min at 15,000 × g at 4°C. The supernatant was removed and the pellet washed once more in 1 ml cold PBS. At this point the pellets can be stored at -80°C or immediately solubilized. To solubilize the pellets, they were vigorously pipetted in 100 μl buffer containing 1.5 M aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris, and pH 7.0. Then, 20 μl of 10% *n*-dodecyl β-D-maltoside (10%, w/v) was added and the cells were incubated on ice for 10 min. After a 30 min centrifugation at 30,000 × g , the super-

natant was mixed with 10 μl of sample buffer (750 mM aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris, 0.5 mM EDTA, and 5% Serva Blue G-250).

Also, mitochondrial membranes from CP of AD and control subjects were isolated. The complexes were separated on a 5–15% acrylamide gel using 50 mM Bis-Tris as the anode buffer, and 15 mM Bis-Tris/50 mM tricine containing 0.02% Serva Blue G-250 as the cathode buffer. Before blotting, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) at 20 V overnight, and probed with specific antibodies. The blots were developed with ECL Plus WB (Amersham) and quantified with the aid of ImageJ software (NIH Image). Enzymatic activity of mitochondrial complexes was measured as described previously (Nijtmans et al., 2002). Gels were incubated overnight at room temperature in the following solutions—(1) for complex I: 2 mM Tris-HCl,

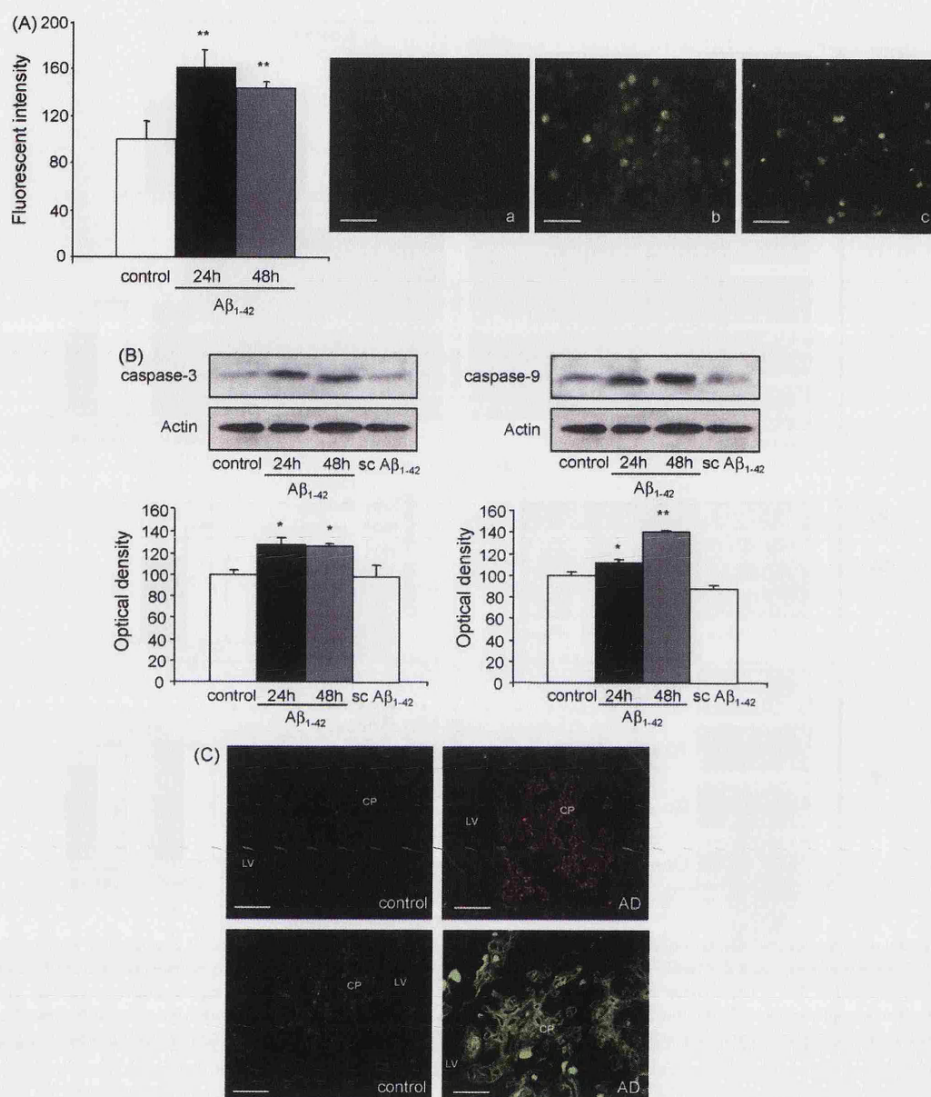


Fig. 3. *In vitro* effects of exposure to Aβ₁₋₄₂ on ROS and caspases expression. (A) DFDA intensity in control, and Aβ₁₋₄₂-treated CP epithelial cells, expressed as a percentages of controls. Signal intensity was averaged for each condition (*n* = 3); ***p* < 0.001, differed significantly from control untreated cells. Micrographs taken from control cells: (a) DFDA stained, and treated with Aβ₁₋₄₂ for (b) 24 h and (c) 48 h. Magnification: 40×. Scale bar = 20 μm. (B) Representative WB analysis of caspase 3 and 9 expression in cell lysates of Aβ₁₋₄₂-treated CP epithelial cells. Increased levels of cleaved caspases are already detectable after 24 h of treatment and maximal after 48 h. However, scrambled Aβ₁₋₄₂ (sc Aβ₁₋₄₂) administration for 48 h did not modify caspase expression (*n* = 5); **p* < 0.05 and ***p* < 0.001 versus untreated cells. (C) Caspase 3 and 9 expression is enhanced in CP from AD patients compared with control subjects. CP sections were immunostained using anti-caspase 3 (upper panel) and anti-caspase 9 (bottom panel) antibodies. Magnification: 20× (CP, choroid plexus; LV, lateral ventricle; *n* of 5–6 per group). Scale bar = 30 μm. Representative blots and quantitative histograms are shown.

pH 7.4, 0.1 mg/ml NADH, and 2.5 mg/ml nitro tetrazolium blue (NTB); and (2) for complex IV: 5 mg 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) dissolved in 9 ml PB (0.05 M and pH 7.4), 1 nM catalase (20 μg/ml), 10 mg cytochrome *c*, and 750 mg sucrose. Gels were washed in distilled water, scanned and photographed immediately.

2.6. H₂O₂/reactive oxygen species (ROS) production

In order to measure ROS, CP epithelial cells were incubated in 1 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium containing 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, 10 μmol/l; Sigma-Aldrich) for 20 min at 37 °C. Afterwards, the cells were washed several times in PBS

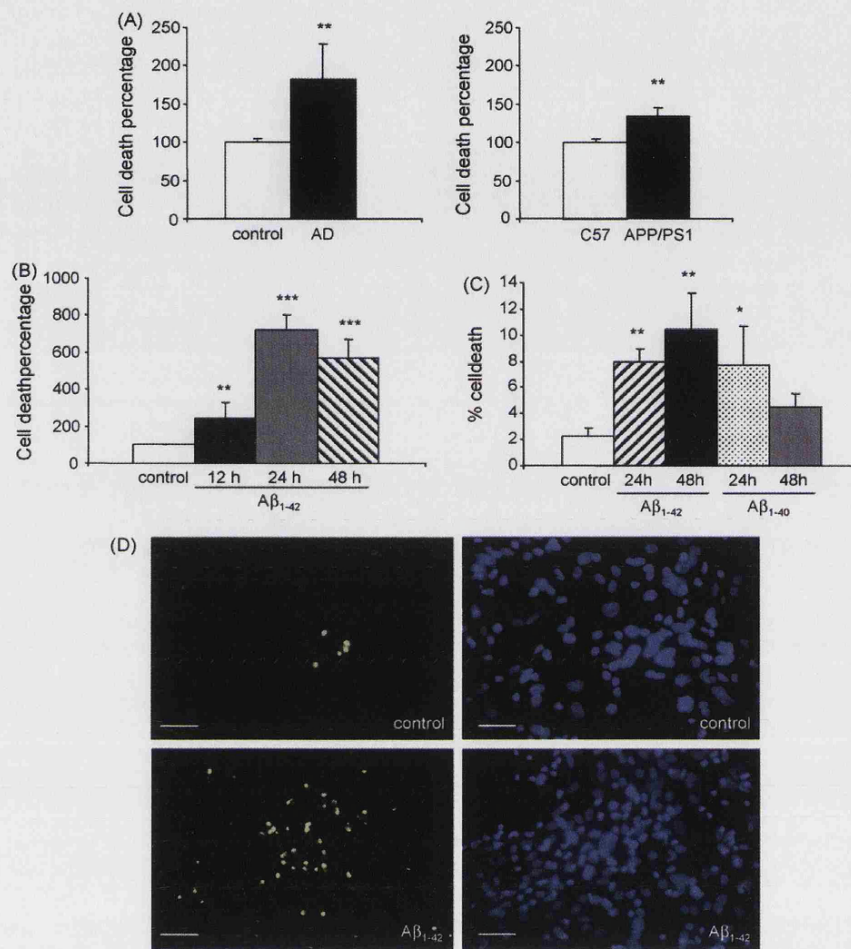


Fig. 4. Effects of exposure to $A\beta$ on cell death in CP of AD patients and APP/PS1 mice. (A) Increased cell death was observed in CP from AD patients and APP/PS1 mice ($n=6$ per group); $**p<0.01$ versus respective controls. (B) $A\beta_{1-42}$ -induced time-dependent increase in CP cell death when injected intracerebroventricularly. Maximal effect was reached after 24 h after $A\beta_{1-42}$ administration ($n=4$ per group); $**p<0.01$ and $***p<0.001$ versus vehicle-injected rats. (C) Time course of $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{1-40}$ in cell death from CP cultures. Maximal cell death was measured after 48 h of $A\beta_{1-42}$ treatment, whereas $A\beta_{1-40}$ -induced cell death was only detected after 24 h of treatment ($n=3$); $*p<0.05$ and $**p<0.01$ versus untreated cells. (D) In CP cultures, apoptotic cell death was also detected by TUNEL 48 h after $A\beta_{1-42}$ administration. Magnification: $40\times$. Scale bar = $20\mu m$.

and visualized immediately under a fluorescent microscope (Axioplan2, Zeiss) coupled to a digital camera (Spot RT-SE, Diagnostic Instruments, Inc.). Fluorescent intensity in cells was measured using ImageJ (NIH) software.

2.7. Cell death quantification

After 24 and 48 h incubations with $A\beta_{1-42}$, 7–8 days *in vitro* CP epithelial cells were harvested with 0.25% trypsin, fixed in 70% methanol, washed several times, incubated for 1 h with 10 mg/ml ribonuclease (Sigma–Aldrich), and stained with 1 mg/ml propidium iodide (Sigma–Aldrich). Finally, samples were analyzed

by flow cytometry (FACScan) using CellQuest software (Becton Dickinson). Cells with less propidium iodide staining (hence a lower DNA content than during G_1 phase) were defined as apoptotic cells (sub- G_1 peak).

DNA fragmentation in CP epithelial cells undergoing apoptosis was also detected with a Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche), according to the manufacturer's protocol.

Apoptotic cell death, in CP epithelial cell culture, was also quantification by In Situ Cell Death Detection kit, Fluorescein (Boehringer Mannheim) – based on the TUNEL method – according to the manufacturer's protocol.

2.8. Determination of NO production

For NO detection, cell cultures and brain tissue were processed using the Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit (BioVision, Inc.) according to the manufacturer's protocol. CP epithelial cells were seeded in a six-well plate, and NO production was determined after 24 h incubation in the presence of A β _{1–42}. In AD and APP/PS1 brain tissue, NO production was evaluated after homogenization. Results are shown as means \pm S.E.M. One-way ANOVA followed by a post hoc Student's *t*-test was used for group comparisons.

3. Results

3.1. NO production is increased in choroid plexus of AD subjects and APP/PS1 mice

Immunohistochemical analysis revealed the presence of A β deposits (Fig. 2A), and thioflavin-positive aggregates (Fig. 1A) in the CP of AD subjects. Our results demonstrated that NO production is significantly enhanced in the CP of APP/PS1 mice and from AD subjects (Fig. 1B). To determine the contribution of A β on NO production, A β _{1–42} was injected into rat ventricles, and NO was evaluated at different times after injection. A β _{1–42} significantly increased NO production by CP after 24 h of treatment when compared to control animals (Fig. 1C). These findings were also tested *in vitro*, and an increase in NO production was observed in CP cultured cells exposed to A β _{1–42} for 24 h (Fig. 1D).

3.2. Mitochondrial damage is observed in choroid plexus of AD subjects and *in vitro*

Mitochondrial dysfunction, probably as a result of A β -stimulated NO production, is one of the earliest defects detected in AD patients (Valla et al., 2001; Manczak et al., 2006; Beal, 2005). There have been no reports on the activity of mitochondrial respiratory chain complexes in non-neuronal tissue. Our immunohistochemical analysis revealed the presence of A β deposits in CP of AD subjects (Fig. 1A), data which correlated with an increased NO production (Fig. 1B). Therefore, the enzymatic activity of the respiratory chain complexes I and IV was evaluated in CP from AD subjects. A decreased activity of both complexes was observed, being 64% and 80% of the control values, respectively (Fig. 2A). The reduction in enzymatic activity paralleled the amount of fully assembled complexes I and IV, assessed by the levels of 30 kDa and Cox Va subunits, respectively, which were also diminished in the AD group when compared to control subjects (Fig. 2A).

With the purpose of demonstrating that A β deposits were responsible for mitochondrial dysfunction in CP, the effects

of A β _{1–42} administration on mitochondrial fractions obtained from CP epithelial cells were examined. The activities of complexes I and IV were significantly impaired by the administration of A β _{1–42} as compared with control cells (Fig. 2B). WB performed to assess protein level alterations revealed a parallel reduction in complex I and IV holocomplexes, reflected by a decrease in 30 kDa and Cox Va subunit levels (Fig. 2B). No changes in the amount of fully assembled respiratory chain complexes II and III were observed in any of the studied tissues.

3.3. A β _{1–42} is associated with hydrogen peroxide levels in choroid plexus epithelial cells

To determine whether A β -induced complexes I and IV activity reduction in isolated mitochondria from CP epithelial cells mitochondria had an effect on the generation of ROS, the production of hydrogen peroxide (H₂O₂) in these cells was measured using DCFH-DA dye. A β _{1–42} (5 μ g/ml) led to a significant increase in intracellular DCF fluorescence (Fig. 3A) compared with non-treated cells (control) after 24 and 48 h of A β _{1–42} exposure. Control cells had a low baseline level of fluorescence which, upon exposure to A β _{1–42}, increased significantly, indicating oxidative stress generation by A β _{1–42}. Fig. 3A shows the mean fluorescent intensity from three independent experiments as a percentage of fluorescent intensity in control cells.

3.4. A β _{1–42} increases caspase 3 and 9 expression in CP epithelial cells

WB analysis revealed a significant increase in caspase 3 and 9 protein expression in CP epithelial cells (Fig. 3B). After exposure to A β _{1–42}, caspase 3 expression increased after incubation for 24 and 48 h, whereas the highest protein level of caspase 9 was detected 48 h after A β _{1–42} exposure (Fig. 3B). We have also treated CP cultures with scrambled A β _{1–42} for 48 h in order to demonstrate specific A β _{1–42} effects (Fig. 3B). This increase in caspases expression has also been detected *in vivo* by fluorescent immunostaining using specific antibodies against caspase 3 (upper panel) and caspase 9 (bottom panel) (Fig. 3C).

3.5. Cell death is increased in CP of AD subjects and APP/PS1 mice

In previous observations, a significant neuronal death, induced, direct or indirectly, by A β accumulation, was observed in AD subjects and APP/PS1 mice (Sadowski et al., 2004; Radde et al., 2006; Gomez-Isla et al., 1996; Braak and Braak, 1997; von Gunten et al., 2005). Using Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit, the same alteration was detected in CP of AD subjects and APP/PS1 mice (Fig. 4A), suggesting a direct effect of A β accumulation on cell death induction. To test this hypothesis, we investigated A β -induced cell death in rats by injecting A β _{1–42} via intracerebroven-

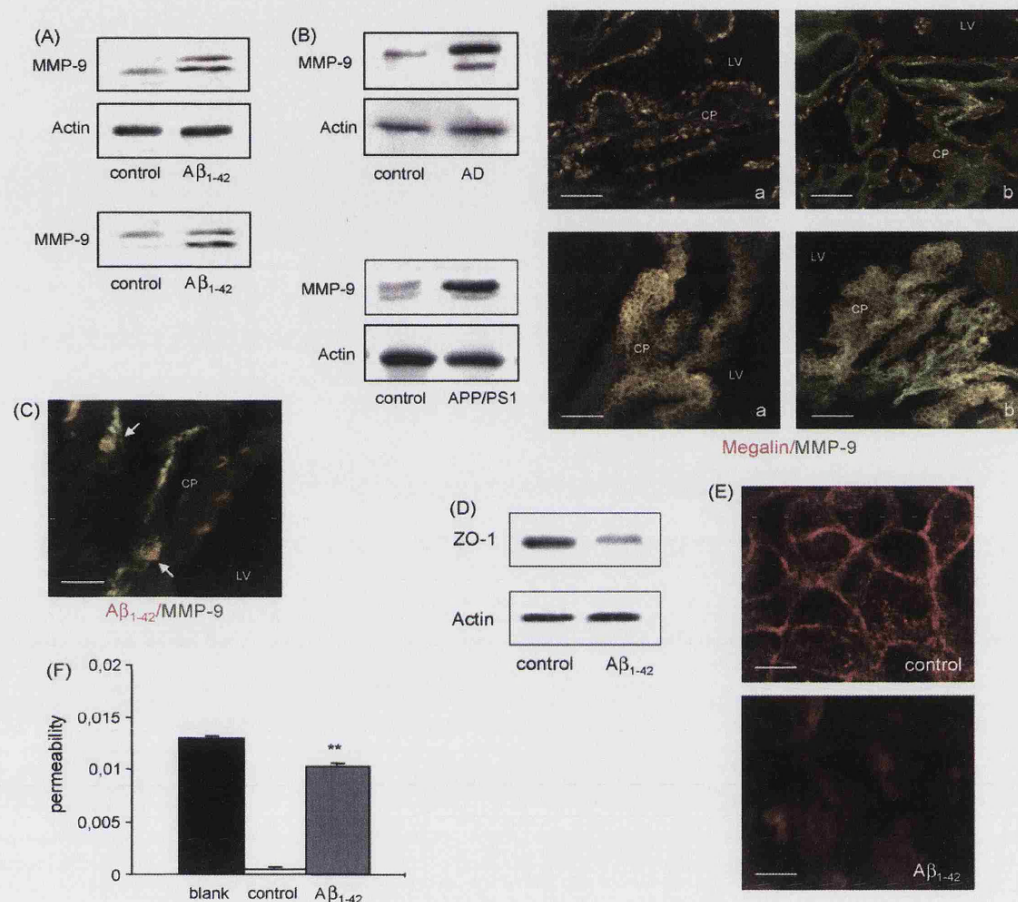


Fig. 5. Aβ₁₋₄₂ effects on MMP-9 expression in CP epithelial cells. (A) Increased synthesis (upper blots) and release of MMP-9 (bottom blot) from CP epithelial cells treated with Aβ₁₋₄₂ for 24 h (n=3). (B) In top panels, MMP-9 levels were increased in CP from AD patients. On the photomicrographs, CP sections were immunostained using anti-megalin (red) and anti-MMP-9 (green) antibodies; MMP-9 expression is significantly enhanced in (b) AD patients compared with (a) control subjects. Magnification: 20× (CP, choroid plexus; LV, lateral ventricle; n=5–6 per group). Scale bar=30 μm. Confocal analysis shows merging of photomicrographs. (C) MMP-9 co-localizes with Aβ₁₋₄₂ peptide in CP from AD patients. Brain sections were immunolabeled using anti-MMP-9 (green) and anti-Aβ₁₋₄₂ (red) antibodies. Magnification: 40× (n=5). Scale bar=10 μm. Confocal analysis shows merging of microphotographs. (D) Tight junction protein ZO-1 was measured after treatment of CP epithelial cells with Aβ₁₋₄₂ for 1 h compared with untreated cells. Magnification: 40×. Scale bar=10 μm. (E) ZO-1 expression is decreased in CP epithelial cells treated with Aβ₁₋₄₂ for 1 h compared with untreated cells. Magnification: 40×. Scale bar=10 μm. (F) Permeability of CP culture, as determined by (¹⁴C)-carboxylated inulin technique, is increased following Aβ₁₋₄₂ treatment for 2 h (n=3); **p<0.01 versus untreated cells. Representative blots are shown.

tricularly. We observed an increase in cell death in CP after Aβ₁₋₄₂ administration, with maximal effects observed after 24 and 48 h of treatment (Fig. 4B). Also, propidium iodide staining and flow cytometry analysis of CP epithelial cells treated with Aβ₁₋₄₂ revealed an increase in cell death (Fig. 4C). The effect on cell death induction was less evident after Aβ₁₋₄₀ treatment (Fig. 4C). Aβ₁₋₄₂-induced apoptotic cell death was also verified by TUNEL in CP cell culture after 48 h of Aβ₁₋₄₂ administration (Fig. 4D). We found 23% of cell death in CP cell culture after Aβ₁₋₄₂ administration compared with 5% of cell death CP untreated cells.

3.6. MMP-9 is increased in CP from AD subjects and APP/PS1 mice

Several studies have indicated that Aβ induces MMP-9 production in astrocytes (Deb et al., 2003; Yin et al., 2006) and cerebral endothelial cells (Lee et al., 2003). Treatment of CP epithelial cells with Aβ₁₋₄₂ for 24 h resulted in an increase of MMP-9 protein levels in both cell lysate and cell culture medium (Fig. 5A). To test the hypothesis that MMP-9 may play a role in CP barrier dysfunction in AD, at least partially due to Aβ-induced high NO levels (Gu et al., 2002) followed by ROS production (Kim et al., 2003), we examined

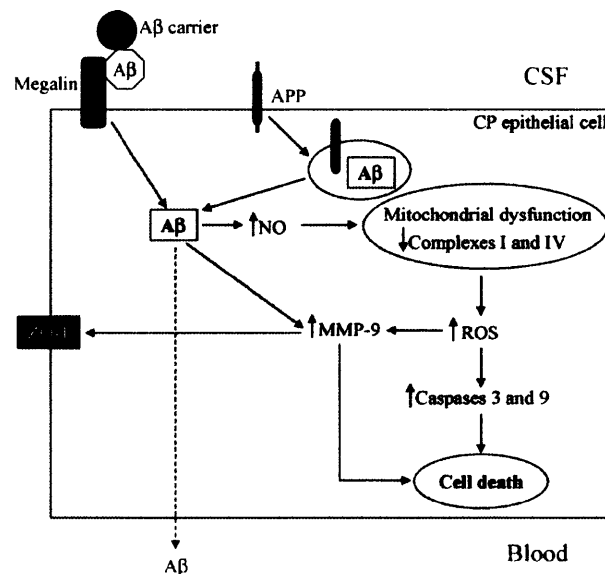


Fig. 6. Hypothetical sequence of events leading to cell death occurring after A β accumulation in CP epithelial cells. Under physiological conditions, A β coupled with its carriers is transported by megalin from the CSF to the blood. On the other hand, A β is produced by endoproteolysis of the amyloid precursor protein (APP). However, different pathways may occur in CP epithelial cells under AD conditions: (1) A β is involved in MMP-9 production increase, degradation of tight junction protein ZO-1, and finally barrier disruption; and (2) A β deposits in CP results in enhanced NO levels followed by mitochondrial dysfunction, which may act as an amplifier due to a reduced activity of complexes I and IV, are involved in ROS generation, activation of caspases 3 and 9, and MMP-9 production. The convergence of all of these pathways results in cell death.

MMP-9 in CP of APP/PS1 mice and AD autopsy brains. WB analysis showed a significant increase in the protein levels of MMP-9 compared to control animals and non-dementia subjects (Fig. 5B). This effect was also identified by double immunohistochemistry using antibodies against MMP-9 and megalin, which bind MMP-9 (Fig. 5B). In addition, in AD subjects MMP-9 co-localized with A β deposits in CP (Fig. 5C), suggesting an association between MMP-9 expression, A β accumulation, and CP barrier dysfunction. It is probable that A β _{1–42}-induced increase in MMP-9 expression reflects a dysfunction of the CP epithelium barrier properties. In support of this, A β _{1–42} produced a decrease in the tight junction protein ZO-1 expression, detected by WB (Fig. 5D), and by fluorescent immunostaining (Fig. 5E). And, as a result, A β _{1–42} also altered cell permeability, indicated by an increase in inulin transport across the epithelial cell monolayer (Fig. 5F).

4. Discussion

Although many studies have implicated apoptosis in the process of A β -mediated neuronal death, the underlying mechanisms have not been completely defined. Mitochondrial dysfunction is one of the earliest defects identified in AD brains (Valla et al., 2001; Manczak et al., 2006; Beal, 2005). Several studies have indicated that A β impairs mitochondrial function (Canevari et al., 1999; Casley et al., 2002).

However, in most studies, *in vitro* models were used to measure the effects of A β on cellular function. In contrast, in the present study *in vivo* models (APP/PS1 transgenic mice and AD patients) were used to investigate AD-specific cell death pathways. Our results demonstrate the presence of A β accumulation in CP of AD brains, which is associated with transcytosis impairment, increased NO production, and cell death mediated by mitochondrial dysfunction.

CP is involved in the most basic aspects of neural function. Diversity of its functions means that even modest changes in the CP can have far-reaching effects. Indeed, changes in the anatomy and physiology of the CP have been linked with aging and several central nervous system diseases, including AD (Serot et al., 2003), and are concurrent with subnormal brain activity. The accumulation of amyloid-like inclusions also known as Biondi ring tangles in CP epithelial cells in cases with AD and aging brains may affect vital functions of the CP (Wen et al., 1999). Pathological changes in CP were also detected in mitochondrial DNA disorders (Cottrell et al., 2001). Our study focused on the brain barrier at the CP epithelium because this specialized structure actively participates in A β clearance (Zlokovic, 2004; Carro et al., 2005). Since A β deposits accumulate in the CP of AD patients (Dietrich et al., 2008), it is likely that A β interferes with its function. Thus, elucidation of the signaling events involved in A β -induced CP dysfunction is necessary to understand the molecular mechanisms underlying AD neurodegeneration.

In this study, we aimed to link A β -induced CP cell death with increased NO production and mitochondrial dysfunction in CP from AD subjects since this pathway has been demonstrated in neuronal cell loss (Keil et al., 2004). Biochemical measures showed increased NO production by the CP of AD patients associated with A β deposits. A similar situation was observed in the CP of 12-month-old APP/PS1 mice, which had a noticeable high A β expression.

In accordance with these findings, we also demonstrate that A β _{1–42}, which is much more neurotoxic than A β _{1–40} (Zhang et al., 2002; Keil et al., 2004; Teng and Tang, 2005) and alters BBB integrity (Marco and Skaper, 2006), produces a significant increase in NO production both *in vivo* and *in vitro*. Excessive generation of NO has been implicated in the pathogenesis of AD (Smith et al., 1997; Aliyev et al., 2004), and plays an important role in A β -induced mitochondrial dysfunction (Keil et al., 2004). We observed a decrease in cytochrome *c* oxidase activity, not only in the cerebral cortex, in accordance with previous data (Maurer et al., 2000; Sarti et al., 2003; Brunori et al., 2004; Devi et al., 2006), but also in the CP of AD patients. The *in vitro* analyses carried out in CP epithelial cells revealed a reduction in the activity of complex IV directly caused by A β exposure. Synthetic A β _{1–42} also reduced complex I activity; this effect was also observed *in vivo*, both in cerebral cortex and CP of AD subjects. This finding is supported by other studies showing that NO interacts with a superoxide radical to form peroxynitrite, which can affect the activity of mitochondrial complex I (Galkin et al., 2007). Another interesting result obtained in our study was that this reduction in the enzyme activities of respiratory chain complexes I and IV correlated with a specific decrease in the expression levels of these complexes. Complex IV levels might decrease by an accumulation of APP across mitochondrial import channels, which has been demonstrated to inhibit the entry of nuclear-encoded complex IV subunits (Devi et al., 2006). Complex I protein might possibly decrease as a result of ROS production that would affect cardiolipin function, as recently demonstrated in ageing brain (Petrosillo et al., 2008). Cardiolipin loss would lead to a specific complex I decrease due to unstabilization of mitochondrial supercomplexes, as demonstrated in patients with a cardiolipin synthesis defect (McKenzie et al., 2006). Taken together, these results suggest that mitochondrial energy metabolism might be impaired by A β through down-regulation of mitochondrial proteins and activity.

In addition, the interaction between NO and cytochrome *c* oxidase controls mitochondrial production of hydrogen peroxide, which has been shown to be implicated in cellular redox signaling (Galli et al., 2003; Carreras et al., 2004). In the present study we used synthetic A β _{1–42} to impair the function of complexes I and IV in CP epithelial cells and to investigate whether ROS generation was also altered. Our results, together with previous findings (Veereshwarayya et al., 2006; Petrosillo et al., 2007), support the hypothesis that A β _{1–42} interferes with oxidative phosphorylation, which

results in oxidative stress, and demonstrate that ROS generation is secondary to mitochondrial damage. Our results also show that A β _{1–42}-treated CP epithelial cells have an increased expression of caspases 3 and 9. This result is consistent with a recent study, where APP transfected cells showed a significant increase in the expression and activity of caspases 3 and 9 (Marques et al., 2003). Our data suggest that the excessive generation of ROS would be responsible for initiating the apoptotic cell death process by up-regulating caspase signaling, as previously demonstrated (Takuma et al., 2005; Zhu et al., 2006).

In view of the results from our *in vitro* and *in vivo* studies, we propose that A β -induced mitochondrial dysfunction provides an important source of ROS, which could ultimately initiate a programmed cell death pathway. In CP from APP/PS1 mice and AD patients, this pathway involves high levels of MMP-9, increased caspases expression and cell loss.

Some reports have shown that A β increases MMP-9 production (Lee et al., 2003; Talamagas et al., 2007); in brain tissue from AD patients, high levels of MMP-9 have been found in the cytoplasm of neurons, neurofibrillary tangles, senile plaques, and vascular walls (Backstrom et al., 1996; Asahina et al., 2001; Lorenzl et al., 2003). Since A β overexpression increases oxidative stress and MMP-9 levels, we hypothesize that the process by which A β induces MMP-9 expression is dependent on mitochondria-derived ROS. This observation is consistent with other *in vivo* studies using superoxide dismutase-1 transgenic mice (Morita-Fujimura et al., 2000; Kim et al., 2003) and *in vitro* studies in murine macrophages (Woo et al., 2004), which suggest that MMP-9 is activated by ROS. Several groups have demonstrated the role of A β -induced MMP-9 in BBB disruption (Kim et al., 2003; Lee et al., 2003; Talamagas et al., 2007). Apparently MMP-9 would be involved in the degradation of several tight junction proteins, including ZO-1 (Harkness et al., 2000; Mori et al., 2002). In our study, we studied the integrity of ZO-1 in extracted CP epithelial cells treated with A β . The addition of A β resulted in a loss of ZO-1 expression. Hence, and in agreement with previous reports, our findings suggest that an elevated expression of MMP-9, induced by A β accumulation in the CP, may facilitate the increase in blood–CSF barrier permeability by a similar mechanism involving proteolytic degradation of ZO-1 or other tight junction proteins (Giebel et al., 2005; Rosenberg and Yang, 2007; Yang et al., 2007).

In conclusion, our results point to the potential importance of ROS as a cofactor for A β -induced impairment of mitochondrial function. Based on our data and previous studies, we propose the following model for A β -induced CP epithelial cell death pathway: A β accumulation → increased NO production → inhibition of mitochondrial complexes I and IV → ROS generation → MMP-9 and caspases overexpression, and finally → cell death (Fig. 6). The elucidation of the signaling events involved in A β -induced CP epithelial cell death is important to understand the molecular mechanisms

underlying A β clearance, in order to design effective pharmacological strategies designed to attenuate AD pathogenesis.

Conflicts of interest

There are no actual or potential conflicts of interest with other people or organizations.

Disclosure statement

All animals were handled and cared for in accordance with EEC guidelines (Directive 86/609/CEE). The study was performed in accordance with the principles contained in the Declaration of Helsinki as revised in 1996. Human studies were approved by the Ethics Committee of the Hospital “12 de Octubre”, and informed consent was obtained from all patients prior to their participation.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (CP04/00179, PI060155) to EC and (CP04/00011, PI050379) to CU, Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña (2006.125), and CIBERNED to EC. We thank Ximena Alvira for editorial assistance.

References

Aliyev, A., Seyidova, D., Rzayev, N., Obrenovich, M.E., Lamb, B.T., Chen, S.G., Smith, M.A., Perry, G., de la Torre, J.C., Aliev, G., 2004. Is nitric oxide a key target in the pathogenesis of brain lesions during the development of Alzheimer's disease? *Neurol. Res.* 26, 547–553.

Asahina, M., Yoshiyama, Y., Hattori, T., 2001. Expression of matrix metalloproteinase-9 and urinary-type plasminogen activator in Alzheimer's disease brain. *Clin. Neuropathol.* 20, 60–63.

Backstrom, J.R., Lim, G.P., Cullen, M.J., Tökés, Z.A., 1996. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1–40). *J. Neurosci.* 16, 7910–7919.

Baud, O., Li, J., Zhang, Y., Neve, R.L., Volpe, J.J., Rosenberg, P.A., 2004. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1713–1717.

Beal, M.F., 2005. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 58, 495–505.

Blanc, E.M., Toborek, M., Mark, R.J., Hening, B., Mattson, M.P., 1997. Amyloid β -peptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. *J. Neurochem.* 68, 1870–1881.

Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E.A., Murri, L., Rapoport, S.I., Solaini, G., 2002. Cytochrome *c* oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 371–376.

Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259.

Braak, H., Braak, E., 1997. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* 18, 351–357.

Brown, G.C., Borutaite, V., 2002. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1440–1450.

Brunori, M., Giuffrè, A., Forte, E., Mastronicola, D., Barone, M.C., Sarti, P., 2004. Control of cytochrome *c* oxidase activity by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Acta* 1655, 365–371.

Canevari, L., Clark, J.B., Bates, T.E., 1999. Beta-amyloid fragment 25–35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett.* 457, 131–134.

Carreras, M.C., Converso, D.P., Lorenti, A.S., Barbich, M., Levisman, D.M., Jaitovich, A., Antico Arciuch, V.G., Galli, S., Poderoso, J.J., 2004. Mitochondrial nitric oxide synthase drives redox signals for proliferation and quiescence in rat liver development. *Hepatology* 40, 157–166.

Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., Torres-Aleman, I., 2002. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med.* 8, 1390–1397.

Carro, E., Spuch, C., Trejo, J.L., Antequera, D., Torres-Aleman, I., 2005. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J. Neurosci.* 25, 10884–10893.

Casley, C.S., Canevari, L., Land, J.M., Clark, J.B., Sharpe, M.A., 2002. Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activity. *J. Neurochem.* 80, 91–100.

Cottrell, D.A., Ince, P.G., Wardell, T.M., Turnbull, D.M., Johnson, M.A., 2001. Accelerated ageing changes in the choroid plexus of a case with multiple mitochondrial DNA deletions. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 27, 206–214.

Deane, R., Zlokovic, B.V., 2007. Role of the blood–brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 191–197.

Deb, S., Wenjun Zhang, J., Gottschall, P.E., 2003. Beta-amyloid induces the production of active, matrix-degrading proteases in cultured rat astrocytes. *Brain Res.* 970, 205–213.

Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G., Anandatheerthavarada, H.K., 2006. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 26, 9057–9068.

Dietrich, M.O., Spuch, C., Antequera, D., Rodal, I., de Yébenes, J.G., Molina, J.A., Bermejo, F., Carro, E., 2008. Megalin mediates the transport of leptin across the blood–CSF barrier. *Neurobiol. Aging* 26, 902–912.

Estus, S., Tucker, H.M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E.F., Wogulis, M., Rydel, R.E., 1997. Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant “apoptotic” pattern of gene induction. *J. Neurosci.* 17, 7736–7745.

Figueroa, S., Oset-Gasque, M.J., Arce, C., Martinez-Hondurilla, C.J., Gonzalez, M.P., 2006. Mitochondrial involvement in nitric oxide-induced cellular death in cortical neurons in culture. *J. Neurosci. Res.* 83, 441–449.

Fukui, H., Diaz, F., Garcia, S., Moraes, C.T., 2007. Cytochrome *c* oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14163–14168.

Galkin, A., Higos, A., Moncada, S., 2007. Nitric oxide and hypoxia. *Essays Biochem.* 43, 29–42.

Galli, S., Labato, M.I., Bal de Kier Joffe, E., Carreras, M.C., Poderoso, J.J., 2003. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Res.* 63, 370–377.

Gasche, Y., Copin, J.-C., Sugawara, T., Fujimura, M., Chan, P.H., 2001. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood–brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1393–1400.

Giebel, S.J., Menicucci, G., McGuire, P.G., Das, A., 2005. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood–retinal barrier. *Lab. Invest.* 85, 597–607.

- Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel Jr., D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T., 1996. Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 4491–4500.
- Gu, Z., Kaul, M., Yan, B., Kridel, S.J., Cui, J., Strongin, A., Smith, J.W., Liddington, R.C., Lipton, S.A., 2002. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297, 1186–1190.
- Harkness, K.A., Adamson, P., Sussman, J.D., Davies-Jones, G.A., Greenwood, J., Woodroffe, M.N., 2000. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain* 123, 698–709.
- Kalaria, R.N., 1999. The blood–brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 893, 113–125.
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C.A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder, J.B., Muller-Spahn, F., Haass, C., Czech, C., Pradier, L., Muller, W.E., Eckert, A., 2004. Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 50310–50320.
- Kim, G.W., Gasche, Y., Grzeschik, S., Copin, J.-C., Maier, C., Chan, P.H., 2003. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood–brain barrier disruption? *J. Neurosci.* 23, 8733–8742.
- Lee, J.M., Yin, K.J., Hsin, I., Chen, S., Fryer, J.D., Holtzman, D.M., Hsu, C.Y., Xu, J., 2003. Matrix metalloproteinase-9 and spontaneous hemorrhage in an animal model of cerebral amyloid angiopathy. *Ann. Neurol.* 54, 379–382.
- Loo, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whittemore, E.R., Walenciewicz, A.J., Cotman, C.W., 1993. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7951–7955.
- Lorenz, S., Albers, D.S., Relkin, N., Ngyuen, T., Hilgenberg, S.L., Chirichigno, J., Cudkowicz, M.E., Beal, M.F., 2003. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 43, 191–196.
- Luth, H.J., Holzer, M., Gartner, U., Staufenbiel, M., Arendt, T., 2001. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res.* 913, 57–67.
- Manzak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H., 2006. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437–1449.
- Marco, S., Skaper, S.D., 2006. Amyloid beta-peptide 1–42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 401, 219–224.
- Marques, C.A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Muller, W.E., Eckert, A., 2003. Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 28294–28302.
- Maurer, I., Zierz, S., Moller, H.J., 2000. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol. Aging* 21, 455–462.
- McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T., 2006. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J. Mol. Biol.* 361, 462–469.
- Melino, G., Bernassola, F., Knight, R.A., Corasaniti, M.T., Nistico, G., Finazzi-Agro, A., 1997. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 388, 432–433.
- Mirra, S.S., Gearing, M., McKeel Jr., D.W., Crain, B.J., Hughes, J.P., van Belle, G., Heyman, A., 1994. Interlaboratory comparison of neuropathology assessments in Alzheimer's disease: a study of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 303–315.
- Miyakawa, T., Kimura, T., Hirata, S., Fujise, N., Ono, T., Ishizuka, K., Nakabayashi, J., 2000. Role of blood vessels in producing pathological changes in the brain with Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 903, 46–54.
- Mori, T., Wang, X., Aoki, T., Lo, E.H., 2002. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 19, 1411–1419.
- Morita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Gasche, Y., Copin, J.C., Chan, P.H., 2000. Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 130–138.
- Nagase, H., Woessner, J.F., 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491–21494.
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., Holt, I.J., 2002. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26, 327–334.
- Petrosillo, G., Portincasa, P., Grattagliano, I., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F.M., Ferri, D., Paradies, G., 2007. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochem. Biophys. Acta* 1767, 1260–1267.
- Petrosillo, G., Matera, M., Casanova, G., Ruggiero, F.M., Paradies, G., 2008. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochem. Int.* (July 9) [Epub ahead of print].
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M.E., Jäggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Hölscher, C., Mathews, P.M., Jucker, M., 2006. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940–946.
- Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., Dencoff, J.E., 1998. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood–brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29, 2189–2195.
- Rosenberg, G.A., Yang, Y., 2007. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg. Focus* 22, E4.
- Sadowski, M., Pankiewicz, J., Scholtzova, H., Tsai, J., Li, Y., Carp, R.I., Meeker, H.C., Gambetti, P., Debnath, M., Mathis, C.A., Shao, L., Gan, W.B., Klunk, W.E., Wisniewski, T., 2004. Targeting prion amyloid deposits in vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 775–784.
- Sarti, P., Arese, M., Giuffrè, A., 2003. The molecular mechanism by which nitric oxide controls mitochondrial complex IV. *Ital. J. Biochem.* 52, 37–42.
- Selkoe, D.J., 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 924, 17–25.
- Serot, J.M., Béné, M.C., Faure, G.C., 2003. Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Front. Biosci.* 8, 515–521.
- Smith, M.A., Richey Harris, P.L., Sayre, L.M., Beckman, J.S., Perry, G., 1997. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 17, 2653–2657.
- Suhara, T., Magrané, J., Rosen, K., Christensen, R., Kim, H.S., Zheng, B., McPhie, D.L., Walsh, K., Querfurth, H., 2003. Abeta42 generation is toxic to endothelial cells and inhibits eNOS function through an Akt/GSK-3beta signaling-dependent mechanism. *Neurobiol. Aging* 24, 437–451.
- Takuma, K., Yao, J., Huang, J., Xu, H., Chen, X., Luddy, J., Trillat, A.C., Stern, D.M., Arancio, O., Yan, S.S., 2005. ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *FASEB J.* 19, 597–598.
- Talamagas, A.A., Efthimiopoulos, S., Tsilibary, E., Figueiredo-Pereira, M.E., Tzinia, A.K., 2007. Abeta (1–40) induced secretion of matrix metalloproteinase-9 results in sAPPα release by association with cell surface APPA. *Neurobiol. Dis.* 28, 304–315.
- Teng, F.Y., Tang, B.L., 2005. Widespread gamma-secretase activity in the cell, but do we need it at the mitochondria? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1–5.

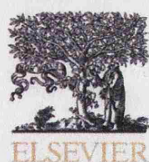
- Valla, J., Berndt, J.D., Gonzalez-Lima, F., 2001. Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Alzheimer's patients: superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration. *J. Neurosci.* 21, 4923–4930.
- Veereshwarayya, V., Kumar, P., Rosen, K.M., Mestrl, R., Querfurth, H.W., 2006. Differential effects of mitochondrial heat shock protein 60 and related molecular chaperones to prevent intracellular beta-amyloid-induced inhibition of complex IV and limit apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 29468–29478.
- von Gunten, A., Kovari, E., Rivara, C.B., Bouras, C., Hof, P.R., Gianakopoulos, P., 2005. Stereologic analysis of hippocampal Alzheimer's disease pathology in the oldest-old: evidence for sparing of the entorhinal cortex and CA1 field. *Exp. Neurol.* 193, 198–206.
- Wen, G.Y., Wisniewski, H.M., Kascsak, R.J., 1999. Biondi ring tangles in the choroid plexus of Alzheimer's disease and normal aging brains: a quantitative study. *Brain Res.* 832, 40–46.
- Werb, Z., 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91, 439–442.
- Woo, C.H., Lim, J.H., Kim, J.H., 2004. Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J. Immunol.* 173, 6973–6980.
- Xu, J., Chen, S., Ku, G., Ahmed, S.H., Chen, H., Hsu, C.Y., 2001. Amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 702–710.
- Yang, Y., Estrada, E.Y., Thompson, J.F., Liu, W., Rosenberg, G.A., 2007. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 697–709.
- Yao, M., Nguyen, T.-V.V., Pike, C.J., 2005. β -Amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J. Neurosci.* 25, 1149–1158.
- Yin, K.J., Lee, J.M., Chen, S.D., Xu, J., Hsu, C.Y., 2002. Amyloid- β induces Smac release via AP-1/Bim activation in cerebral endothelial cells. *J. Neurosci.* 22, 9764–9770.
- Yin, K.J., Hsu, C.Y., Hu, X.Y., Chen, H., Chen, S.W., Xu, J., Lee, J.M., 2006. Protein phosphatase 2A regulates bim expression via the Akt/FKHLi signaling pathway in amyloid- β peptide-induced cerebrovascular endothelial cell death. *J. Neurosci.* 26, 2290–2299.
- Zhang, Y., McLaughlin, R., Goodyer, C., LeBlanc, A., 2002. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1–42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J. Cell Biol.* 156, 519–529.
- Zhu, Y., Hoell, P., Ahlemeyer, B., Kriegstein, J., 2006. PTEN: a crucial mediator of mitochondria-dependent apoptosis. *Apoptosis* 11, 197–207.
- Zlokovic, B.V., 2004. Clearing amyloid through the blood–brain barrier. *J. Neurochem.* 89, 807–811.

[REDACTED]: Antequera D*, T*, Ugalde C, Spuch C, Molina JA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E. "***Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease***". Neurobiol Dis. 2009 Jul 14. [Epub ahead of print].

*These authors have contributed equally to this work

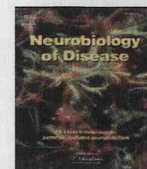
Resumen

Se piensa que la acumulación de A β es un evento crítico en la patología de la EA, porque induce múltiples efectos neurotóxicos, incluyendo disfunción mitocondrial y muerte celular apoptótica. Por lo tanto, la reducción de A β se considera una primera diana terapéutica. La proteína gelsolina, una proteína de unión a A β , ha sido considerada como potencial inhibidora de la apoptosis, aunque los mecanismos que lo explican son todavía desconocidos. Para aclarar estos efectos, manipulamos los niveles de gelsolina citoplasmática a partir de sobre-expresión mediada por un vector viral en el cerebro de ratones transgénicos APP/PS1. Observamos que la gelsolina reduce la carga de A β cerebral en los ratones APP/PS1, posiblemente por aumentar el aclaramiento de A β vía LRP2/megalina. Paralelamente a la reducción de los niveles de A β cerebral, se produjo la inhibición de la producción de óxido nítrico y de la muerte celular, no solo en los plexos coroideos sino también en la corteza cerebral. La sobre-expresión de gelsolina restauró la actividad mitocondrial alterada en estos ratones APP/PS1, resultando en un incremento en la actividad de la citocromo C oxidasa. En contraste, el tratamiento con un RNA de interferencia que bloquea la expresión de gelsolina, confirmó que la gelsolina citoplasmática actúa como un modulador de los niveles de A β cerebral y sus efectos neurotóxicos. Por lo tanto, sugerimos que la gelsolina podría prevenir la amiloidosis cerebral y las alteraciones mitocondriales apoptóticas inducidas por A β . Estos resultados hacen pensar que la modulación de la gelsolina citoplasmática podría ser utilizada como una potencial estrategia terapéutica en la EA.



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease

Desiree Antequera^{a,b,1}, Teo Vargas^{a,b,1}, Cristina Ugalde^{c,d}, Carlos Spuch^{a,b}, Jose Antonio Molina^{b,e}, Isidro Ferrer^{b,f}, Felix Bermejo-Pareja^{b,e}, Eva Carro^{a,b,*}

^a Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^b Neurodegenerative Diseases Biomedical Research Center (CIBERNED), Madrid, Spain

^c Mitochondrial Diseases Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^d Rare Disorders Biomedical Research Center (CIBERER), Madrid, Spain

^e Neurology Service, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^f Neuropathology Institute, Anatomopathology Service IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2008

Revised 24 April 2009

Accepted 28 June 2009

Available online 14 July 2009

Keywords:

Alzheimer's disease

Gelsolin

Lentiviral vectors

Choroid plexus

Mitochondrial dysfunction

Nitric oxide

Cell death

Amyloid burden

Transgenic mice

ABSTRACT

Accumulation of amyloid- β (A β) peptides is thought to be a critical event in the pathology of Alzheimer's disease (AD), because they induce multiple neurotoxic effects, including mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death. Therefore the reduction of A β is considered a primary therapeutic target. Gelsolin, an A β binding protein, has been shown to inhibit apoptosis, although the underlying mechanism is unclear. To clarify these effects, we manipulated cytoplasmic gelsolin levels through viral-directed overexpression in the brain of APP/Ps1 transgenic mice. We observed that gelsolin reduces brain A β burden in the APP/Ps1 mice, possibly by enhancing A β clearance via megalin. The reduction in brain A β levels was accompanied by an inhibition of nitric oxide production and cell death, not only in the choroid plexus but also in the cerebral cortex. Notably, overexpressed gelsolin restored the impaired mitochondrial activity in the APP/Ps1 mice, resulting in the increase of cytochrome *c* oxidase activity. By contrast, RNA interference to block gelsolin expression, confirmed that cytoplasmic gelsolin acts as a modulator of brain A β levels and its neurotoxic effects. We conclude that gelsolin might prevent brain amyloidosis and A β -induced apoptotic mitochondrial changes. These findings make cytoplasmic gelsolin a potential therapeutic strategy in AD.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of cognitive function and several neuropathological features which include amyloid plaques, neurofibrillary tangles, synaptic loss, and neurodegeneration. Senile plaques consist mainly of an extracellular accumulation of the peptide amyloid β (A β), a 40–42-aminoacid length peptide (Selkoe, 1989; Selkoe, 2000), although intracellular deposits of A β have also been reported (Knauer et al., 1992; Glabe, 2001). In AD, A β accumulates in epithelial cells of the choroid plexus (Dietrich et al., 2008) and in the cerebrovascular wall, where it induces blood–brain barrier disruption (Kalaria, 1999; Miyakawa et al., 2000; Deane and Zlokovic, 2007). Neuronal cell death is also associated with this A β accumulation, and involves the activation of mitochondrial-dependent apoptotic path-

ways (Loo et al., 1993; Estus et al., 1997; Yao et al., 2005; Qiao et al., 2005; Yin et al., 2006; Vargas et al., 2008).

Another feature of AD brains is mitochondrial dysfunction (Maurer et al., 2000; Blass, 2000; Cardoso et al., 2004; Lin and Beal, 2006), characterized by an increase in mitochondrial membrane permeability and loss of membrane potential, and associated with the release of cytochrome *c* (Petit et al., 1997; Marzo et al., 1998). Recent studies have highlighted the role of mitochondrial A β in AD pathogenesis (Lustbader et al., 2004; Caspersen et al., 2005; Manczak et al., 2006; Devi et al., 2006; Vargas et al., 2008).

Gelsolin is a potent actin-regulatory protein that controls cytoskeletal assembly and disassembly (Sun et al., 1999). It is located intracellularly and extracellularly, as a secretory plasma protein (Kwiatkowski et al., 1986). Gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via membrane potential loss and cytochrome *c* release (Koya et al., 2000; Qiao et al., 2005). Under physiologic conditions, gelsolin binds to A β (Chauhan et al., 1999), and inhibits its fibrillation (Ray et al., 2000). Some reports have indicated that administration of gelsolin reduces the amyloid load in the β -amyloid precursor protein (APP)-transgenic mouse models of AD (Matsuoka et al., 2003; Hirko et al., 2007).

* Corresponding author. Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba s/n. 28041 Madrid, Spain. Fax: +34 91 390 85 44.

E-mail address: carroeva@h12o.es (E. Carro).

¹ These authors have contributed equally to this work.

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

Nevertheless, these studies have been conducted using the plasma form of gelsolin. Then, we decided to study whether the cytosolic form of gelsolin could also prevent A β -induced toxicity in a mouse model of AD. To test our hypothesis, we overexpressed gelsolin or gelsolin RNA interference (siRNA) using lentiviral vectors in APP/presenilin-1 (Ps1) transgenic mice. We demonstrate the existence of a significant form-dependent effect of gelsolin on A β burden and amyloid formation. Moreover, expression of gelsolin in APP/Ps1 mice elicited reduced nitric oxide (NO) production, increased mitochondrial complex IV activity, and cell death, not only in the choroid plexus but also in the cerebral parenchyma. Our data indicates that gelsolin, which specifically binds brain A β via the endocytic receptor megalin, may reduce A β burden and its consequent neurotoxicity in a mouse model of AD.

Materials and methods

Mutant mice

Double-transgenic APP/Ps1 mice (9 months of age), a cross of the Tg2576 (overexpressing human APP695) and mutant Ps1 (M146L) mice, were used as a model of AD amyloidosis. Non-transgenic littermates were used as controls. All animals were handled and cared for in accordance with European Economic Community guidelines.

Vector suspensions (2 μ l per mouse) were stereotactically injected in each lateral ventricle [brain coordinates (mm from bregma): 0.6 posterior, 1.1 lateral, 2 ventral] with a 10 μ l syringe at 1 μ l/min. Animals were perfused transcardially with saline buffer or 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for biochemical and immunohistochemical analysis, respectively.

Human samples

Subjects were selected on the basis of post-mortem diagnosis of AD according to the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's disease (CERAD) criteria (Mirra et al., 1994). Two groups of human brain samples were used in this study: (1) from AD patients, consisting of 4 men and 2 women (mean age 68.33 ± 4.35 years), and (2) from aged controls, consisting of 3 men and 3 women without neurological disease or cognitive impairment (mean age 60.5 ± 5.22 years). Human brain tissue was obtained from the Neuropathology Institute, Anatomopathology Service, IDIBELL-Hospital "Universitario de Bellvitge" (Barcelona, Spain). Pieces of choroid plexus were extracted from the frozen brains and divided in two portions. The portion used for biochemical analysis was solubilized in a buffer containing NP-40, followed by a buffer containing 2% SDS; the other portion was processed for immunohistochemical analysis.

We also studied 16 AD patients (7 men and 9 women; mean age 70.25 ± 9.8 years) who had been given a clinical diagnosis of probable AD by the Working Group of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's disease and Related Disorders Association (McKhann et al., 1984). Non-demented control samples were taken from age-matched subjects without cognitive impairment or symptoms of neurodegenerative disease. This group comprised 14 subjects (8 women and 6 men; mean age 70.69 ± 6.7 years).

After obtaining a written informed consent from all subjects prior to their participation, lumbar cerebrospinal fluid (CSF) samples were collected in a plastic tube, and immediately frozen and stored at -80°C until biochemical analysis.

Lentiviral vectors

Lentiviral vectors using a four-plasmid transfection system were produced as described previously (Dull et al., 1998). To construct the plasmid encoding the human gelsolin, Xba I and BamHI, restriction sites at the 5' and 3' ends, respectively, were added to the cDNA of the full-length human cytoplasmic gelsolin cloned into the pEGFP-N1

plasmid (kindly provided by Veerle De Corte, Ghent University, Ghent, Belgium) PCR using Taq polymerase (New England Biolabs). Total PCR products were ligated into the pGEMT-Easy vector (Promega Corporation), digested by Xba I/BamHI and finally cloned into pRRLsin18.PPT.CMV.eGFP transfer vector. To block gelsolin expression, a small interfering gelsolin RNA (siRNA) was ligated into the pRRLsin.PPT.hPGK.GFPpre (vector) between the XhoI and SalI sites. Previously, gelsolin siRNA sequence was subcloned into the pGEMT-Easy vector. The sequence used in this study consisted of nucleotides 635–655 of the gelsolin gene (Gen-Bank accession number, NM001004080), in both sense and antisense orientation, separated by a nine nucleotide spacer sequence. Packaging, purification and titer determination of the lentivirus were performed as described previously (Carro et al., 2005). Empty vector (no insert) was used as a control (void vector, HIV-vv) in all experiments.

Cell culture

Choroid plexus epithelial cell monolayers from P3–P5 Wistar rats were prepared as described by Carro et al. (2002). Cells were grown to confluence for 5–7 days and serum starved for 2 h. Cells were grown to confluence for 5–7 days and serum starved for 2 h. Afterwards a human analog peptide corresponding to A β_{1-40} (5 μ g/ml; AnaSpec Inc., and gelsolin (5 μ g/ml; Sigma) extracted from bovine plasma, were added. Forty-eight hours after stimulation, cells were either fixed for immunocytochemistry or homogenized for immunoblotting. In other experiments, fresh DMEM containing particles (1 μ g/ml) and 8 μ g/ml polybrene (Sigma) were added to the cultures and replaced after 24 h, as described previously (Carro et al., 2005).

Antibodies

The following antibodies were used: rabbit polyclonal anti-A β_{1-40} (Chemicon), mouse monoclonal anti-gelsolin (Sigma), mouse monoclonal anti- β actin (Sigma), and mouse monoclonal antibodies anti-NDUFA9, anti-SDHA, anti-Core II, and anti-COX 5A (Molecular Probes, Invitrogen). Secondary antibodies were Alexa-coupled (Molecular Probes, Invitrogen), or HRP-conjugated (Bio-Rad). Images were captured using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope (Leica Microsystems).

Western-blot analysis

Western-blot analysis and immunoprecipitation were performed as described by Carro et al. (2002). Western-blot membranes were re-blotted with the same antibody used for immunoprecipitation or with unrelated proteins (β actin) as an internal standard, and to normalize for protein load. Densitometric analysis was performed using ImageJ software (NIH Image). Non-immune normal rabbit serum was used as a control for immunoprecipitation studies.

Immunohistochemistry and immunofluorescence

For detection of A β deposits, brain sections from APP/Ps1 mice were pre-incubated in 88% formic acid and immunostained as reported previously (Carro et al., 2002). To determine A β burden in APP/Ps1 mice, we used an antibody recognizing both endogenous (murine) and transgenic (human) A β peptides (MBL). Stereological analysis of stained brain amyloid was done. Results were expressed as the percentage of brain area covered with amyloid. Amyloid deposits in parenchyma were also evaluated using thioflavin-S and Congo Red staining.

ELISA of A β_{40} and A β_{42}

A β levels in guanidine lysates were performed in brain samples from APP/Ps1 mice. In brief, cortical tissue was homogenized in a

denaturing buffer containing 5 M guanidine. The extracts were diluted and analyzed with A β ₄₀ and A β ₄₂ ELISA kits (Biosource) following the manufacturer's instructions. The assays' sensitivity limits were between 2 and 8 pg/ml.

Blue native electrophoresis

Mitochondrial membranes were isolated according to the method described by Nijtmans et al., (2002). Enzyme activity of mitochondrial complexes from choroid plexus epithelial cell cultures and choroid plexus isolated from APP/Ps1 mice, were measured as described previously (Vargas et al., 2008). Gels were washed in distilled water, scanned, photographed, and quantified with the aid of ImageJ software (NIH Image) (Vargas et al., 2008).

Determination of NO production

For NO detection, choroid plexus epithelial cell cultures and choroid plexus isolated from APP/Ps1 mice were processed using the Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit (BioVision, Inc.) as described previously (Vargas et al., 2008).

Cell death quantification

Cell death was quantified from choroid plexus epithelial cell cultures by flow cytometry (FACScan) using CellQuest software (Becton Dickinson). DNA fragmentation in choroid plexus epithelial cell cultures and choroid plexus isolated from APP/Ps1 mice undergoing apoptosis was also detected with a Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche), as described previously (Vargas et al., 2008).

Results

Gelsolin overexpression reduces A β burden in APP/Ps1 mice

We previously showed that cytoplasmic and secretory (plasma) gelsolin forms bound A β (Fig. 1A), in agreement with previous studies (Chauhan et al., 1999; Ray et al., 2000; Ji et al., 2008). As described in the Materials and methods section, we produced two lentiviral (HIV) vectors coding for cytoplasmic gelsolin (HIV-Gelsolin) and siRNA of gelsolin (HIV-siGelsolin) (Fig. 1B). Transfection efficiency was tested in choroid plexus epithelial cell culture (Fig. 1C), and later *in vivo*, by intracerebroventricular (i.c.v.) injection, within the choroid plexus of the APP/Ps1 mice. This resulted in increased or reduced choroid plexus levels of gelsolin 3 months later, respectively (Fig. 1D).

Stereological analysis of brain amyloid stained with an antibody recognizing both endogenous (murine) and transgenic (human) A β peptides (Fig. 2A), indicated that in APP/Ps1 mice, an HIV-Gelsolin injection during 3 months elicited a reduction in the percentage of brain parenchyma stained with amyloid. Amyloid staining in APP/Ps1 mice treated with HIV-Gelsolin showed a 37% decrease in the cerebral cortex ($20.08 \pm 0.88\%$ in untreated APP/Ps1 mice versus $12.57 \pm 0.58\%$ in treated mice, $p < 0.05$), and a 28% decrease in the hippocampus ($2.14 \pm 0.1\%$ in untreated APP/Ps1 mice versus $1.5 \pm 0.09\%$ in treated mice, $p < 0.05$). In addition, amyloid staining in APP/Ps1 mice treated with HIV-siGelsolin significantly increased in the cerebral cortex and in the hippocampus (38% and 36%, respectively). Further analysis with thioflavin staining (Fig. 2B) gave qualitatively similar results in APP/Ps1 mice injected both with HIV-Gelsolin or HIV-siGelsolin. Congo Red staining evidenced a reduction in the number of amyloid deposits after HIV-Gelsolin injection (Fig. 2C, middle panel) and an increase in amyloid deposit number after HIV-siGelsolin (Fig. 2C, right panel).

Changes in A β ₄₀ and A β ₄₂ after HIV-Gelsolin or HIV-siGelsolin treatments were also quantified by ELISA, confirming the results obtained with immunohistochemistry. APP/Ps1 mice treated with HIV-Gelsolin showed a 50% decrease of insoluble A β ₄₀ in the cerebral

cortex: 31 ± 8 pg/ml in HIV-Gelsolin treated versus 87 ± 21 pg/ml in untreated APP/Ps1 mice ($p < 0.05$), whereas levels of insoluble A β ₄₂ remained unchanged. On the contrary, as was also seen in the immunohistochemical analysis, the levels of both brain A β forms showed a tendency to increase in APP/Ps1 mice after HIV-siGelsolin injection; however this increase did not reach statistical significance (data not shown).

Gelsolin overexpression attenuates NO production and neuronal death in APP/Ps1 mice

Recently, we demonstrated that NO production is significantly enhanced in the choroid plexus of APP/Ps1 mice (Vargas et al., 2008). In this study, we wanted to determine whether prolonged modulation of cytoplasmic gelsolin expression also affected *in vivo* NO levels and neuronal death in APP/Ps1 mice. For that purpose, first, we studied choroid plexus samples obtained from our APP/Ps1 transgenic mice. Overexpression of gelsolin in the choroid plexus of APP/Ps1 elicited a reduction in NO production ($p < 0.05$, Fig. 3A). Next, we analyzed APP/Ps1 treated with HIV-siGelsolin, and observed a significant increase in NO production in the choroid plexus when compared with control animals ($p < 0.05$, Fig. 3A). In addition, a significant cell death was detected in choroid plexus of APP/Ps1 mice (Fig. 3B), agreeing with our previous studies (Vargas et al., 2008). This effect was also modulated by overexpression ($p < 0.05$, Fig. 3B) or blockage of gelsolin ($p < 0.01$, Fig. 3B).

Secondly, we wanted to determine whether these changes in NO production and cell death were also present in APP/Ps1 cerebral cortex. We found that, whereas HIV-Gelsolin injection reduced the enhanced NO production observed in the cerebral cortex of APP/Ps1 mice, HIV-siGelsolin significantly increased cortical NO levels ($p < 0.05$, Fig. 3C). As we expected, APP/Ps1 mice did not have widespread cortical neuronal loss (Fig. 3D). However, a significant neuronal death was detected in APP/Ps1 mice treated with HIV-siGelsolin for 3 months ($p < 0.01$, Fig. 3D).

Gelsolin overexpression increases mitochondrial respiratory chain activity in APP/Ps1 mice

Several studies have indicated a direct interaction of A β with mitochondrial membranes, resulting in the inhibition of complex IV *in vivo* (Canevari et al., 1999; Mancuso et al., 2003). Mancuso et al., 2003). Our findings confirmed that mitochondrial complex IV activity was significantly reduced in APP/Ps1 mice in comparison to controls (Fig. 4A). To determine whether modulation of A β burden in APP/Ps1 mice injected with HIV-Gelsolin and HIV-siGelsolin, resulted in alterations of mitochondrial function, we evaluated the enzyme activity of the respiratory chain complex IV in the cerebral cortex of these mice. HIV-Gelsolin i.c.v. injection resulted in a 2-fold increase in complex IV activity ($p < 0.01$) (Fig. 4A). On the contrary, when gelsolin function was interfered by i.c.v. injection of HIV-siGelsolin, enzymatic activity of the complex IV was significantly reduced ($p < 0.05$, Fig. 4A).

Blue native blots to assess protein level alterations revealed a parallel enhancement in complex IV holocomplex from APP/Ps1 mice injected with HIV-Gelsolin. This was reflected by an increase in COX 5A subunit levels ($P < 0.05$, Fig. 4B), whereas HIV-siGelsolin APP/Ps1 mice showed decreased levels of COX 5A subunit ($P < 0.05$, Fig. 4B).

Modulating gelsolin expression in APP/Ps1 mice by i.c.v. gene delivery also elicited significant alterations in complex I and II protein levels, indicated by changes in the expression of NDUFA9 and Core II subunits, respectively (Supplementary Fig. 1).

Gelsolin expression is reduced in AD patients

Notably, AD patients also have very low levels of gelsolin in the choroid plexus compared with control subjects, as detected by

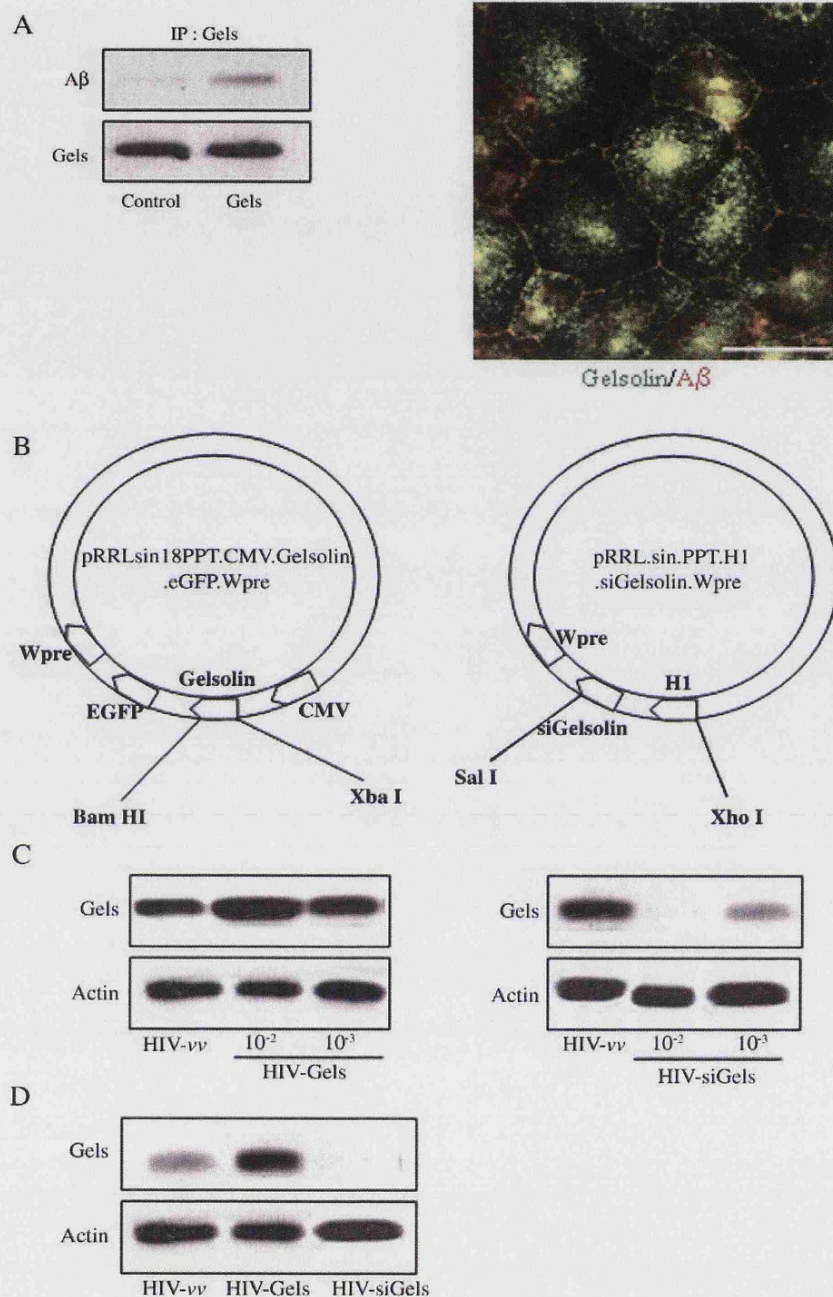
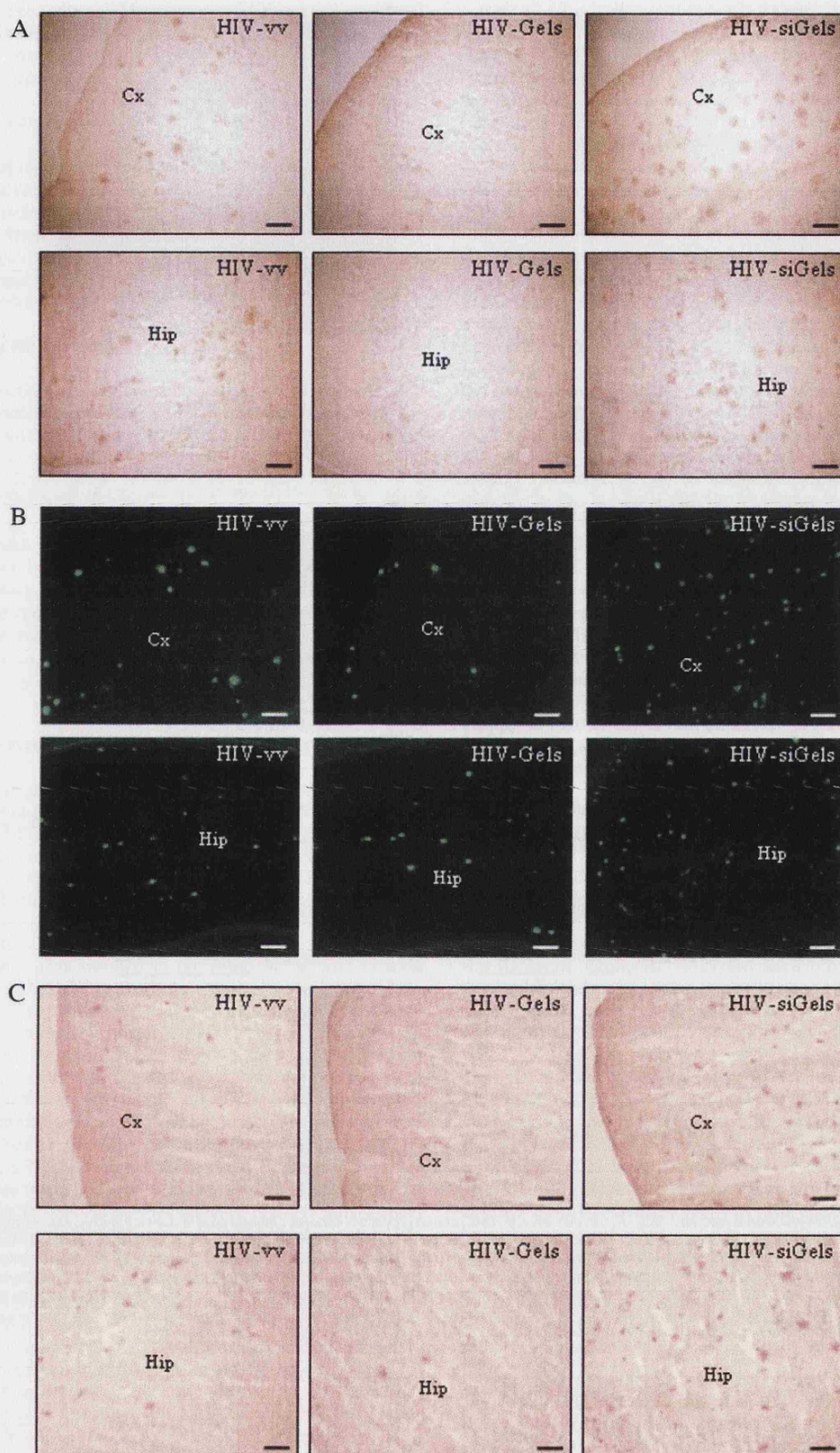


Fig. 1. Gelsolin expression in choroid plexus epithelial cells. (A) Gelsolin binds to A β in choroid plexus cell cultures. Confocal images showing gelsolin colocalization with exogenously added A β in choroid plexus cell cultures. Representative blots are shown, and three independent experiments were run for each experiment. Scale bars, 10 μ m. IP: immunoprecipitation. (B) Gelsolin overexpression was achieved using a cytomegalovirus (CMV) promoter in a GFP plasmid (left panel). A gelsolin small interfering RNA (siRNA) was ligated into the HIV-transfer vector with a human H1 promoter (right panel). (C) Western blots confirmed overexpression (left panel) and blockage (right panel) of gelsolin in lysates from rat choroid plexus cells transfected, at 10^{-2} and 10^{-3} dilution, with HIV-Gelsolin and HIV-siGelsolin, respectively. (D) Levels of choroid plexus gelsolin in APP/PS1 transgenic mice were modified by viral expression of gelsolin and siGelsolin. Note that the levels of the unrelated protein actin remained undisturbed after expression of HIV-siGelsolin, suggesting specificity of RNA interference. Representative blots are shown ($n = 10$).

western blot (Fig. 5A), and by fluorescent immunostaining (Fig. 5B). As expected, CSF gelsolin levels were also significantly reduced in AD patients (Fig. 5C). These results suggest that a defective expression of gelsolin in AD patients could be directly involved in A β -induced neurotoxicity.

Discussion

Gelsolin is an actin-regulatory protein located in intracellular as well as extracellular compartments (Kwiatkowski et al., 1986, 1988). It is present in a large variety of cell types including neurons (Stossel,



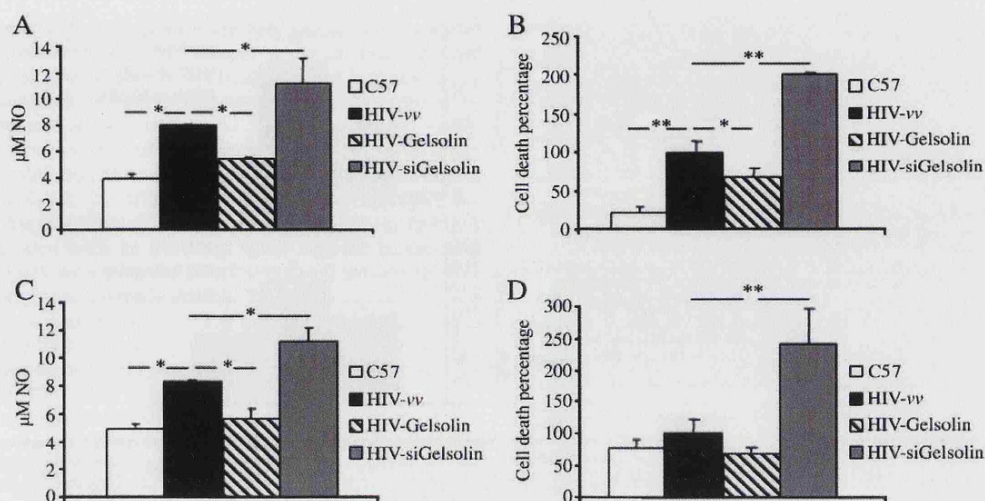


Fig. 3. Gelsolin expression modulates NO production and cell death in APP/Ps1 mice. High NO production from APP/Ps1 was reduced in choroid plexus (A) and cerebral cortex (C) 3 months after gelsolin delivery. Note an increase of NO production after HIV-siGelsolin treatment in choroid plexus (A) and cerebral cortex (C). (B) Increased cell death was observed in choroid plexus from APP/Ps1 mice. Gelsolin treatment partially reversed this toxic effect, and HIV-siGelsolin injection enhanced it. (D) Cell death in cerebral cortex from APP/Ps1 mice increased 3 months after siGelsolin gene delivery ($n = 4$ per group); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus untreated APP/Ps1 mice.

1990) and choroid plexus (Matsumoto et al., 2003). Our findings indicate that cytoplasmic gelsolin is involved in the pathology of AD by regulating brain A β and its neurotoxic effects, probably through a process of disassembling of preformed amyloid fibrils, as has been suggested by other authors (Chauhan et al., 1999; Ray et al., 2000). In the present study, we confirm the formation of a complex between cytoplasmic and secreted gelsolin with A β (Chauhan et al., 1999; Ji et al., 2008; Chauhan et al., 2008).

Amyloid peptides play a central role in the development of AD. They are known to induce mitochondrial dysfunction and caspase activation, resulting in cell death (Bosetti et al., 2002; Casley et al., 2002; Devi et al., 2006; Fukui et al., 2007; Vargas et al., 2008). Cell death-associated mitochondrial dysfunction, membrane potential loss and of cytochrome *c* release, are all abolished in the presence of cytoplasmic gelsolin (Koya et al., 2000; Qiao et al., 2005). Based on these facts, we decided to investigate whether i.c.v. gene delivery of cytoplasmic gelsolin in APP/Ps1 mice would alter A β effects and amyloid burden. To confirm this possible effect of gelsolin, we also blocked choroid plexus gelsolin expression by siRNA. Lentiviral-mediated expression of cytoplasmic gelsolin for 3 months resulted in a reduction in cortical and hippocampal A β burden in APP/Ps1 mice. The mechanism for this brain amyloid reduction is still not clear, but it might involve a direct action of cytoplasmic gelsolin on the brain parenchyma. I.c.v. injection of HIV-gelsolin could induce a significant increase in protein expression in the cerebral cortex or hippocampus as we confirmed by immunocytochemical localization of GFP (Supplementary Fig. 2), and as has been shown with other lentiviral vectors (Baekelandt et al., 2002). HIV-gelsolin could be contributing to the solubilization of preformed A β fibrils (Chauhan et al., 2008). Based on its functions as an A β carrier protein (Chauhan et al., 1999; Matsuoka et al., 2003; Hirko et al., 2007) the endogenous secretory form of gelsolin could be responsible for transporting A β across the choroid plexus barrier, from the brain to the blood, in a manner similar to blood gelsolin (Ji et al., 2008).

In agreement with a previous report, where inducible nitric oxide synthase (iNOS) reactivity, expression and activity increased in APP tg 2576 transgenic mice (Rodrigo et al., 2004), we observed an enhanced production of NO in the cerebral cortex of APP/Ps1 mice. We also found a decreased complex IV activity in our mouse model of amyloidosis. Our results correlate with studies on AD patients, which have reported a reduction in COX activity in AD platelets and post-mortem brain samples (Cardoso et al., 2004; Kish et al., 1992; Mancuso et al., 2003; Vargas et al., 2008), and on APP tg 2576 transgenic mice (Hauptmann et al., 2008). In accordance with Aleardi et al. (2005), we also found a reduction in the expression levels of mitochondrial complexes I and III. We speculate that this mitochondrial dysfunction is probably due to the fact that A β -related mitochondrial dysfunction is exacerbated by aging, and may be one of the mechanisms explaining the pronounced accumulation of AD-pathology with aging. However, the detailed mechanism underlying the neurotoxic activity of A β still remains unclear. Recent findings suggest that extracellular amyloid aggregates can cross membranes and accumulate in the cytosol (Thakur et al., 2009; Ren et al., 2009).

Overexpression of cytoplasmic gelsolin in brain parenchyma of APP/Ps1 mice results in a decrease of NO production, accompanied by an upregulation of mitochondrial complex IV activity. Several studies have demonstrated that cytoplasmic gelsolin can inhibit apoptosis by blocking signal transduction at the mitochondrial level in lymphocytes (Koya et al., 2000; Kusano et al., 2000). One possible mechanism to explain this could be the regulation of a voltage-dependent anion channel by intracellular gelsolin associated with mitochondrial membranes (Furukawa et al., 1997; Kusano et al., 2000; Koya et al., 2000). Gelsolin has been shown to inhibit apoptosis by blocking cytochrome *c* release (Koya et al., 2000; Qiao et al., 2005). In our study, we describe a novel mechanism by which gelsolin modulates mitochondrial function by increasing mitochondrial complex IV activity.

Fig. 2. Gelsolin expression modulates brain A β burden in the brain of APP/Ps1 mice. (A) Amyloid deposits in cerebral cortex (Cx, upper panels) and hippocampus (Hip, lower panels) of APP/Ps1 mice were reduced by i.c.v. HIV-Gelsolin compared with HIV-vv control animals. APP/Ps1 mice showed increased A β burden 3 months after HIV-siGelsolin gene delivery. A β was detected with an antibody recognizing both human and murine A β . (B) A β deposits were detected with thioflavin staining in cerebral cortex (Cx, upper panels) and hippocampus (Hip, lower panels) of APP/Ps1. (C) Amyloid deposits were also detected with Congo Red staining. Note the similarity of gelsolin-induced effects between staining methods ($n = 4$ animals per group). Scale bars, 10 μ m.

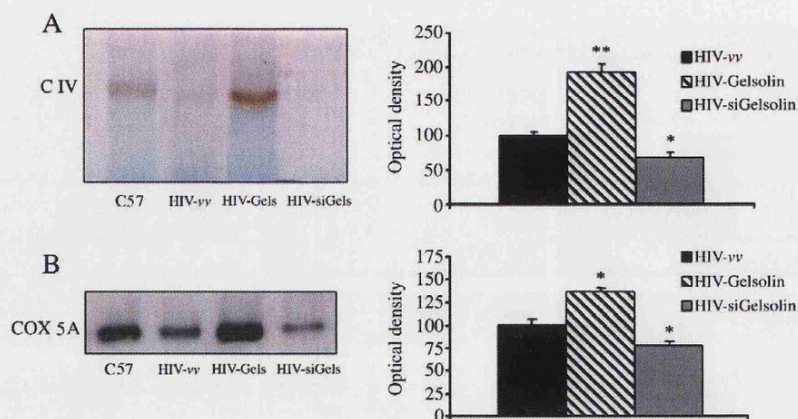


Fig. 4. Gelsolin expression modulates mitochondrial respiratory chain activity in APP/PS1 mice. (A) Reduced mitochondrial complex IV in-gel activity in cerebral cortex from APP/PS1 mice increased 3 months after gelsolin gene delivery. HIV-siGelsolin treatment reduced complex IV activity to values lower than those in untreated APP/PS1 mice. (B) Blue native analysis of these tissue samples, assessed by the levels of COX 5A subunit, showed altered protein expression in the mitochondrial complex IV. Representative blue native blots and quantitative histograms are shown ($n = 4$ per group); * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus untreated APP/PS1 mice.

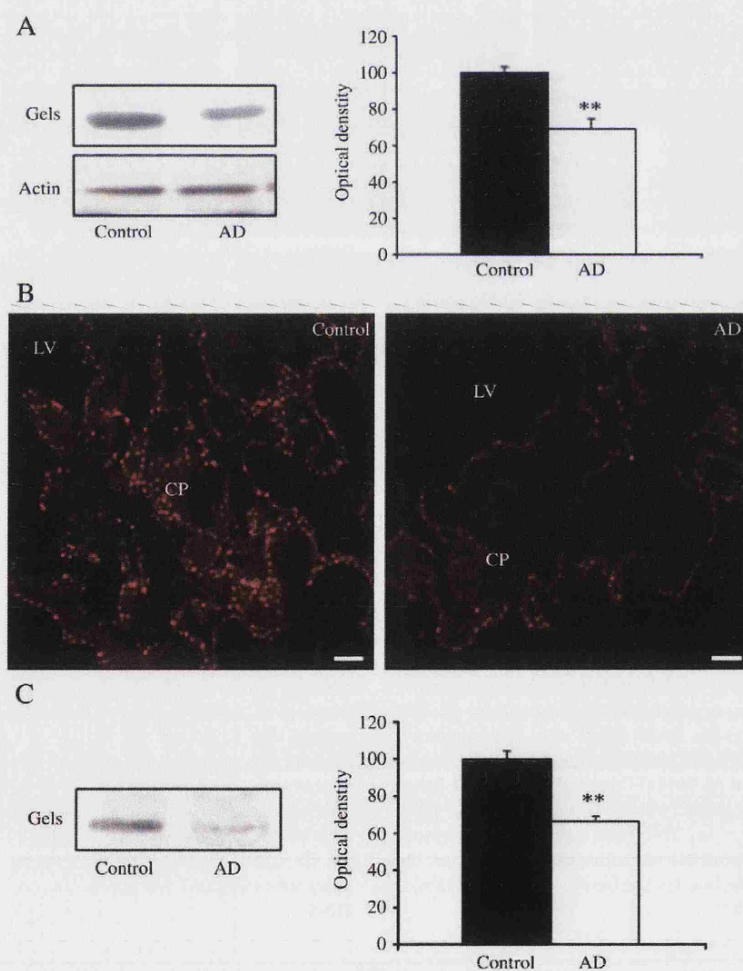


Fig. 5. Gelsolin expression in brain in AD patients. (A) Gelsolin expression is reduced in choroid plexus lysates from AD patients compared with healthy subjects ($n = 6$ per group); ** $p < 0.01$ versus control group. (B) Gelsolin immunoreactivity (red) was more intense in the choroid plexus of control subjects. (C) Levels of secreted gelsolin in the CSF of AD patients were lower than in healthy subjects ($n = 14$ and 16 per group, respectively); ** $p < 0.01$ versus control group. Representative blots and quantitative histograms are shown.

The effects of cytoplasmic gelsolin are very similar in the choroid plexus. While cell death was undetectable in the cerebral cortex of APP/Ps1 mice, the choroid plexus exhibited a robust increase in cell death, which was partially reverted by gelsolin treatment, probably by blockage of caspase-3 activity (Ohtsu et al., 1997; Kamada et al., 1998).

Indirectly, this gelsolin-induced reduction of brain A β levels resulted in the inhibition of A β -induced cell death through its effects on mitochondrial activity and NO production. Furthermore, we observed that the inhibition of gelsolin gene expression in APP/Ps1 mice was associated with an increased brain amyloid burden and apoptotic responses, indicating that interference with gelsolin leads to a sensitization to proapoptotic stimuli. This observation is in line with *in vitro* experiments showing that gelsolin-null neurons have enhanced cell death (Endres et al., 1999), and vulnerability of cultured hippocampal neurons to toxic agents is greater in cells lacking gelsolin (Furukawa et al., 1997; Qiao et al., 2005).

Our data extends the results from previous *in vivo* studies describing cytoplasmic gelsolin effects on brain A β and amyloid burden. Our findings also indicate that intracellular gelsolin regulates the activity of mitochondrial respiratory chain complex IV, thereby affecting the reduction of NO production and cell death. In addition, we show that cytoplasmic gelsolin also protects against A β -induced toxic effects within the choroid plexus barrier, where it would be involved in the maintenance of the blood–CSF barrier integrity and A β clearance.

Finally, and based on our results, we suggest that the intracellular gelsolin form has a remarkable neuroprotective significance. Our results showed an important reduction in intracellular gelsolin in choroid plexus, and secretory gelsolin in the CSF from AD patients, agreeing with other studies where the expression of different A β carrier proteins, including transthyretin, is decreased (Merched et al., 1998; Dietrich et al., 2008; Gloeckner et al., 2008). Thus, enhancement of gelsolin activity may represent a novel way to protect against A β neurotoxicity, and may be used as an effective therapeutic strategy for treating AD.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (CP04/00179, PI060155) and Comunidad de Madrid (2006.125) awarded to E. Carro, and by FIS (PI050379) to C. Ugalde. Brain samples were collected from the Brain Bank for Neurological Research, Universidad Complutense, Madrid, Spain. We thank Dr. O. Domínguez (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain) for his help in designing gelsolin siRNA, and Dr. V. De Corte (Department of Medical Protein Chemistry, Ghent University, Belgium) for his gelsolin cDNA gift. We thank Ximena Alviria-Botero for the editorial assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.nbd.2009.06.018.

References

Aleardi, A.M., Benard, G., Augereau, O., Maltat, M., Talbot, J.C., Mazat, J.P., Letellier, T., Dachary-Prigent, J., Solaini, G.C., Rossignol, R., 2005. Gradual alteration of mitochondrial structure and function by beta-amyloids: importance of membrane viscosity changes, energy deprivation, reactive oxygen species production, and cytochrome c release. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 207–225.

Baekelandt, V., Claeys, A., Eggermont, K., Lauwers, E., De Strooper, B., Nutton, B., Debyser, Z., 2002. Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. *Hum. Gene Ther.* 13, 841–853.

Blass, J.P., 2000. The mitochondrial spiral. An adequate cause of dementia in the Alzheimer's syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 924, 170–183.

Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E.A., Murri, L., Rapoport, S.I., Solaini, G., 2002. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 371–376.

Canevari, L., Clark, J.B., Bates, T.E., 1999. beta-Amyloid fragment 25–35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett.* 457, 131–134.

Cardoso, S.M., Santana, I., Swerdlow, R.H., Oliveira, C.R., 2004. Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances Abeta toxicity. *J. Neurochem.* 89, 1417–1426.

Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., Torres-Aleman, I., 2002. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat. Med.* 8, 1390–1397.

Carro, E., Spuch, C., Trejo, J.L., Antequera, D., Torres-Aleman, I., 2005. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J. Neurosci.* 25, 10884–10893.

Casley, C.S., Canevari, L., Land, J.M., Clark, J.B., Sharpe, M.A., 2002. Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activity. *J. Neurochem.* 80, 91–100.

Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J.W., Xu, H.W., Stern, D., McKhann, G., Yan, S.D., 2005. Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J.* 19, 2040–2041.

Chauhan, V., Ji, L., Chauhan, A., 2008. Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease. *Biogerontology* 9, 381–389.

Chauhan, V.P., Ray, I., Chauhan, A., Wisniewski, H.M., 1999. Binding of gelsolin, a secretory protein, to amyloid beta-protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 241–246.

Deane, R., Zlokovic, B.V., 2007. Role of the blood–brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 191–197.

Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G., Anandatheerthavarada, H.K., 2006. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 26, 9057–9068.

Dietrich, M.O., Spuch, C., Antequera, D., Rodal, I., de Yébenes, J.G., Molina, J.A., Bermejo, F., Carro, E., 2008. Megalin mediates the transport of leptin across the blood–CSF barrier. *Neurobiol. Aging* 29, 902–912.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., Naldini, L., 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 72, 8463–8471.

Endres, M., Fink, K., Zhu, J., Stagliano, N.E., Bondada, V., Geddes, J.W., Azuma, T., Mattson, M.P., Kwiatkowski, D.J., Moskowitz, M.A., 1999. Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke. *J. Clin. Invest.* 103, 347–354.

Estus, S., Tucker, H.M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E.F., Wogulski, M., Rydel, R.E., 1997. Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant “apoptotic” pattern of gene induction. *J. Neurosci.* 17, 7736–7745.

Fukui, H., Diaz, F., Garcia, S., Moraes, C.T., 2007. Cytochrome c oxidase deficiency in neurons decreases both oxidative stress and amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14163–14168.

Furukawa, K., Fu, W., Li, Y., Witke, W., Kwiatkowski, D.J., Mattson, M.P., 1997. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 17, 8178–8186.

Glabbe, C., 2001. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J. Mol. Neurosci.* 17, 137–145.

Gloeckner, S.F., Meyne, F., Wagner, F., Heinemann, U., Krasnianski, A., Meissner, B., Zerr, I., 2008. Quantitative analysis of transthyretin, tau and amyloid-beta in patients with dementia. *J. Alzheimer's Dis.* 14, 17–25.

Hauptmann, S., Scherping, I., Dröse, S., Brandt, U., Schulz, K.L., Jendrach, M., Leuner, K., Eckert, A., Müller, W.E., 2008. Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiol. Aging*. (Electronic publication ahead of print).

Hirko, A.C., Meyer, E.M., King, M.A., Hughes, J.A., 2007. Peripheral transgene expression of plasma gelsolin reduces amyloid in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mol. Ther.* 15, 1623–1629.

Ji, L., Chauhan, A., Chauhan, V., 2008. Cytoplasmic gelsolin in pheochromocytoma-12 cells forms a complex with amyloid beta-protein. *NeuroReport* 19, 463–466.

Kalaria, R.N., 1999. The blood–brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 893, 113–125.

Kamada, S., Kusano, H., Fujita, H., Ohtsu, M., Koya, R.C., Kuzumaki, N., Tsujimoto, Y., 1998. A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8532–8537.

Kish, S.J., Bergeron, C., Rajput, A., Dozic, S., Mastrogiovanni, F., Chang, L.J., Wilson, J.M., DiStefano, L.M., Nobrega, J.N., 1992. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 59, 776–779.

Knauer, M.F., Soreghan, B., Burdick, D., Kosmoski, J., Glabe, C.G., 1992. Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7437–7441.

Koya, R.C., Fujita, H., Shimizu, S., Ohtsu, M., Takimoto, M., Tsujimoto, Y., Kuzumaki, N., 2000. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 275, 15343–15349.

Kusano, H., Shimizu, S., Koya, R.C., Fujita, H., Kamada, S., Kuzumaki, N., Tsujimoto, Y., 2000. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDCC. *Oncogene* 19, 4807–4814.

Kwiatkowski, D.J., Stossel, T.P., Orkin, S.H., Mole, J.E., Colten, H.R., Yin, H.L., 1986. Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature* 323, 455–458.

Kwiatkowski, D.J., Mehl, R., Yin, H.L., 1988. Genomic organization and biosynthesis of secreted and cytoplasmic forms of gelsolin. *J. Cell Biol.* 106, 375–384.

Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795.

Loe, D.T., Copani, A., Pike, C.J., Whittemore, E.R., Walencewicz, A.J., Cotman, C.W., 1993. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7951–7955.

- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., Trinchese, F., Liu, S., Gunn-Moore, F., Lue, L.F., Walker, D.G., Kuppusamy, P., Zewier, Z.L., Arancio, O., Stern, D., Yan, S.S., Wu, H., 2004. AβAD directly links Aβeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304, 448–452.
- Mancuso, M., Filosto, M., Bosetti, F., Ceravolo, R., Rocchi, A., Tognoni, G., Manca, M.L., Solaini, G., Siciliano, G., Murri, L., 2003. Decreased platelet cytochrome c oxidase activity is accompanied by increased blood lactate concentration during exercise in patients with Alzheimer disease. *Exp. Neurol.* 182, 421–426.
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., Reddy, P.H., 2006. Mitochondria are a direct site of Aβeta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1437–1449.
- Marzo, I., Susin, S.A., Petit, P.X., Ravagnan, L., Brenner, C., Larochette, N., Zamzami, N., Kroemer, G., 1998. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett.* 427, 198–202.
- Matsumoto, N., Kitayama, H., Kitada, M., Kimura, K., Noda, M., Ide, C., 2003. Isolation of a set of genes expressed in the choroid plexus of the mouse using suppression subtractive hybridization. *Neuroscience* 117, 405–415.
- Matsuoka, Y., Saito, M., LaFrancis, J., Saito, M., Gaynor, K., Olm, V., Wang, L., Casey, E., Lu, Y., Shiratori, C., Lemere, C., Duff, K., 2003. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *J. Neurosci.* 23, 29–33.
- Maurer, I., Zierz, S., Moller, H.J., 2000. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol. Aging* 21, 455–462.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M., 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939–944.
- Merched, A., Serot, J.M., Visvikis, S., Aguilon, D., Faure, G., Siest, G., 1998. Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients: relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry. *FEBS Lett.* 425, 225–228.
- Mirra, S.S., Gearing, M., McKeel Jr., D.W., Crain, B.J., Hughes, J.P., van Belle, G., Heyman, A., 1994. Interlaboratory comparison of neuropathology assessments in Alzheimer's disease: a study of the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53, 303–315.
- Miyakawa, T., Kimura, T., Hirata, S., Fujise, N., Ono, T., Ishizuka, K., Nakabayashi, J., 2000. Role of blood vessels in producing pathological changes in the brain with Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 903, 46–54.
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., Holt, I.J., 2002. Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26, 327–334.
- Ohtsu, M., Sakai, N., Fujita, H., Kashiwagi, M., Gasa, S., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Sakiyama, Y., Kobayashi, K., Kuzumaki, N., 1997. Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J.* 16, 4650–4656.
- Petit, P.X., Zamzami, N., Vayssière, J.L., Mignotte, B., Kroemer, G., Castedo, M., 1997. Implication of mitochondria in apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 174, 185–188.
- Qiao, H., Koya, R.C., Nakagawa, K., Tanaka, H., Fujita, H., Takimoto, M., Kuzumaki, N., 2005. Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin. *Neurobiol. Aging* 26, 849–855.
- Ray, I., Chauhan, A., Wegiel, J., Chauhan, V.P., 2000. Gelsolin inhibits the fibrillization of amyloid beta-protein, and also defibrillizes its preformed fibrils. *Brain Res.* 853, 344–351.
- Ren, P.H., Lauckner, J.E., Kachirskaja, I., Heuser, J.E., Melki, R., Kopito, R.R., 2009. Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nat. Cell Biol.* 11, 219–225.
- Rodrigo, J., Fernández-Vizarra, P., Castro-Blanco, S., Bentura, M.L., Nieto, M., Gómez-Isla, T., Martínez-Murillo, R., Martínez, A., Serrano, J., Fernández, A.P., 2004. Nitric oxide in the cerebral cortex of amyloid-precursor protein (SW) Tg2576 transgenic mice. *Neuroscience* 128, 73–89.
- Selkoe, D.J., 1989. The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease. *Ann. Med.* 21, 73–76.
- Selkoe, D.J., 2000. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 924, 17–25.
- Stossel, T.P., 1990. Actin-membrane interactions in eukaryotic mammalian cells. In: Hoffman, J.F., Giebisch, G. (Eds.), *Current Topics in Membranes and Transport*. New York Academic Press, pp. 97–107.
- Sun, H.Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., Yin, H.L., 1999. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 274, 33179–33182.
- Thakur, A.K., Jayaraman, M., Mishra, R., Thakur, M., Chellgren, V.M., Byeon, I.J., Anjum, D.H., Kodali, R., Creamer, T.P., Conway, J.F., Gronenborn, A.M., Wetzel, R., 2009. Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 380–389.
- Yao, M., Nguyen, T.-V.V., Pike, C.J., 2005. β-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-2. *J. Neurosci.* 25, 1149–1158.
- Yin, K.J., Hsu, C.Y., Hu, X.Y., Chen, H., Chen, S.W., Xu, J., Lee, J.M., 2006. Protein phosphatase 2A regulates bim expression via the Akt/FKHL1 signaling pathway in amyloid-β peptide-induced cerebrovascular endothelial cell death. *J. Neurosci.* 26, 2290–2299.
- Vargas, T., Ugalde, C., Spuch, C., Antequera, D., Morán, M.J., Martín, M.A., Ferrer, I., Bermejo-Pareja, F., Carro, E., 2008. Aβeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis. *Neurobiol. Aging*. (Electronic publication ahead of print).

1.2. Alteraciones estructurales

[REDACTED]: Vargas T*, Antequera D*, Ugalde C, Spuch C, Carro E. “*Gelsolin restores Abeta-induced alterations in choroid plexus epithelium*”. J Biomed Biotechnol. 2010 Jan 19. *These authors have contributed equally to this work

Resumen

Histológicamente, la EA se caracteriza, entre otras lesiones, por placas seniles y depósitos cerebrovasculares de A β . En estudios previos hemos demostrado que en pacientes con EA el A β también se acumula en los plexos coroideos, y que este proceso está asociado con disfunción mitocondrial y muerte de células epiteliales. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares que explican la acumulación de A β en el epitelio de los plexos coroideos. En el proceso de aclaramiento de A β , desde el cerebro hacia la sangre, están involucradas proteínas transportadoras de A β que se unen a LRP2/megalina. Entre ellas podrían figurar la gelsolina, una proteína producida específicamente por las células epiteliales de los plexos coroideos. En este estudio, demostramos que el tratamiento con gelsolina soluble reduce la alteración inducida por A β del citoesqueleto del epitelio de los plexos coroideos. Adicionalmente, nuestros resultados demuestran que la gelsolina soluble juega un importante papel reduciendo la citotoxicidad inducida por A β al inhibir la producción de óxido nítrico y las alteraciones mitocondriales apoptóticas. En conclusión, y como ya se ha comentado anteriormente, se refuerza el posible uso de la gelsolina como tratamiento profiláctico en la EA.

Gelsolin restores A β -induced alterations in choroid plexus epithelium

Teo Vargas^{1,2*}, Desiree Antequera^{1,2*}, Cristina Ugalde^{3,4}, Carlos Spuch^{1,2}, Eva Carro^{1,2}

¹Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

²Neurodegenerative Diseases Biomedical Research Center (CIBERNED), Madrid,
Spain

³Mitochondrial Diseases Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid,
Spain

⁴Rare Disorders Biomedical Research Center (CIBERER), Madrid, Spain

Corresponding author

Dr. Eva Carro

Neuroscience Laboratory, Research Center

Hospital 12 de Octubre

Avenida de Córdoba, s/n

Madrid-28041. Spain

Phone: +34 913908765

Fax: +34-913908544

E-mail: carroeva@h12o.es

*These authors have contributed equally to this work

ABSTRACT

Histologically, Alzheimer's disease (AD) is characterized by senile plaques and cerebrovascular amyloid deposits. In previous studies we demonstrated that in AD patients, amyloid- β ($A\beta$) peptide also accumulates in choroid plexus, and that this process is associated with mitochondrial dysfunction and epithelial cell death. However, the molecular mechanisms underlying $A\beta$ accumulation at the choroid plexus epithelium remain unclear. $A\beta$ clearance, from the brain to the blood, involves $A\beta$ carrier proteins that bind to megalin, including gelsolin, a protein produced specifically by the choroid plexus epithelial cells. In this study, we show that treatment with gelsolin reduces $A\beta$ -induced cytoskeletal disruption of blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier at the choroid plexus. Additionally, our results demonstrate that gelsolin plays an important role in decreasing $A\beta$ -induced cytotoxicity by inhibiting nitric oxide production and apoptotic mitochondrial changes. Taken together, these findings make gelsolin an appealing tool for the prophylactic treatment of AD.

Keywords: Tight junctions, cell death, Alzheimer's disease, cytoskeleton, toxicity

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of cognitive function, and is associated with neuropathological hallmarks that include amyloid plaques, neurofibrillary tangles, synaptic loss, and neurodegeneration. Senile plaques mainly consist of an extracellular accumulation of the 40-42-aminoacid long peptide amyloid β ($A\beta$) [1,2], although intracellular deposits of $A\beta$ have also been reported [3,4]. Besides accumulating in the brain parenchyma, $A\beta$ also accumulates in choroid plexus epithelial cells [5] and in cerebrovascular walls, where it induces blood-brain barrier disruption [6,7,8]. Several studies have shown that $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ alter transmembrane and cytoplasmic tight junction proteins in brain microvessel endothelial cells, including ZO-1, which ultimately leads to disruption in the integrity of the blood-brain barrier [9,10].

In support of these findings, recent results from our laboratory have suggested direct relationship between $A\beta$ accumulation at the choroid plexus epithelium and the development of functional and structural dysfunctions [5,11]. In addition, we demonstrated the existence of a link between $A\beta$ -induced choroid plexus cell death, increased production of nitric oxide (NO) and mitochondrial dysfunction in the choroid plexus of patients with AD and amyloid precursor protein (APP)/PS1 mice [11].

The choroid plexus, which is made up of a single epithelial cell layer, is responsible for producing cerebrospinal fluid (CSF), and constitutes the blood-CSF barrier. Additionally, choroid plexus cells produce proteins involved in several processes important for normal brain function, such as prevention of $A\beta$ fibrillization. One of such proteins is gelsolin [12], which is a potent actin-regulatory protein that controls cytoskeletal assembly and disassembly [13]. Gelsolin can be found both as an intrinsic cytoplasmic protein and as a secreted protein [14]. Besides controlling formation of

cytoplasmic actin filaments, gelsolin plays an important role in apoptosis and amyloidosis. The secretory form of gelsolin is known to bind A β under normal physiological conditions [15], inhibit the fibrillation of A β and defibrillize preformed fibrils of this peptide [16]. Some groups have suggested that gelsolin could be used in the prophylactic treatment of AD as A β sequestering agent [17,18].

In this study, we hypothesize that the secreted form of gelsolin could be an effective therapeutic approach for the preservation of blood-CSF barrier integrity and function, and thus an attractive tool for the prophylactic treatment of AD. To test the hypothesis that secreted gelsolin can reduce A β cytotoxicity on choroid plexus epithelium, we analyzed cytoskeletal alterations, including the distribution and expression of ZO-1. In addition, we assessed A β -induced NO production, cell death, and mitochondrial changes in choroid plexus epithelial cells.

METHODS

Cell culture. Epithelial cell monolayers from P3-P5 Wistar rats were prepared as described previously [19]. Cells were grown to confluence for 5-7 days and serum starved for 2 hours. Human analog peptides corresponding to A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ or scrambled A β ₁₋₄₂ 5 μ g/ml; AnaSpec, Inc.), and gelsolin, extracted from bovine plasma, (5 μ g/ml; Sigma), were added. Forty-eight hours after stimulation, cells were either fixed for immunocytochemical analysis or homogenized for immunoblot determination.

Antibodies. The following antibodies were used: mouse monoclonal anti- A β ₁₋₄₀ (Chemicon), rabbit polyclonal anti- A β ₁₋₄₂ (Chemicon), goat polyclonal anti-megalin (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-gelsolin (Sigma), mouse monoclonal anti-pSer (Sigma), goat polyclonal anti-ZO-1 (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-CoxVa (Molecular Probes), BIODIPY® FL phalloidin (Invitrogen), Alexa-coupled (Molecular Probes), and HRP-conjugated (Bio-Rad).

Western-blot analysis. Western-blot (WB) analysis and immunoprecipitation were performed as described previously [19]. WB membranes were re-blotted with the same antibody used for immunoprecipitation, and to normalize for protein load. Densitometric analysis was performed using ImageJ software (NIH). Non-immune normal rabbit serum was used as a control for immunoprecipitation studies.

Blue Native electrophoresis. Mitochondrial membranes were isolated according to the method described by Nijtmans et al. [20]. Enzyme activity of mitochondrial complexes from choroid plexus epithelial cell cultures were measured as described previously [11].

RESULTADOS

Gels were washed in distilled water, scanned, photographed immediately, and quantified with the aid of ImageJ software (NIH) [11].

Determination of NO production. For NO detection, choroid plexus epithelial cell cultures were processed using the Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit (BioVision, Inc.) as described previously [11].

Cell death quantification. After 48-hour incubations with A β ₁₋₄₂ and gelsolin, DNA fragmentation in choroid plexus epithelial cells undergoing apoptosis was detected with a Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche) as described previously [11].

RESULTS

Gelsolin binds to megalin and forms a complex with A β

We observed that megalin from rat choroid plexus cells binds to A β ₁₋₄₀ and to gelsolin (Figure 1A). Furthermore, our results indicate that both the cytoplasmic and the secreted forms of gelsolin bind to megalin (Figure 1A, top panel). These findings were corroborated by immunoprecipitation and double immunostaining, which showed that gelsolin co-localizes with megalin and A β in choroid plexus epithelial cells (Figure 1B).

Gelsolin inhibits A β -induced disruption on choroid plexus epithelial cell cytoskeleton

Choroid plexus epithelial cells exposed to A β ₁₋₄₂ for 48 hours showed a disrupted plasma membrane pattern of ZO-1 with relocation of this protein to the cytoplasm (Figure 2A). A β ₁₋₄₂-induced disruption of epithelial barrier integrity was also confirmed by an increase on serine phosphorylation rate. Immunoprecipitation with anti-ZO-1, followed by immunoblotting with anti-pSer, showed an increase in serine ZO-1 phosphorylation, and a reduction in ZO-1 expression in choroid plexus epithelial cells (Figure 2B). We found that co-administration of gelsolin restored these A β ₁₋₄₂-induced effects (Figure 2A, 2B). Moreover, this A β ₁₋₄₂-induced effect on the behavior of this tight junction protein was also accompanied by cytoskeletal disruption, as we observed the formation actin stress fibers (Figure 2C, middle panel). The immunocytochemical analysis revealed a restoration of cytoskeletal assembly when gelsolin was added to the culture medium (Figure 2C, right panel).

Gelsolin inhibits A β -induced NO production and neuronal death in choroid plexus epithelial cells

Gelsolin blocked A β ₁₋₄₂-induced NO production by cultured choroid plexus epithelial cells after 48 hours of treatment (Figure 3A). *In vitro*, A β ₁₋₄₂-induced cell death in choroid plexus epithelial cells was also reversed after 48 hours of gelsolin administration (Figure 3B).

Gelsolin increases mitochondrial respiratory chain activity in choroid plexus epithelial cells

When gelsolin was added to the choroid plexus culture, an increased activity of complex IV was observed as compared with control cells (Figure 3C). Moreover, gelsolin was able to reverse the inhibitory effect of A β in complex IV activity (Figure 3C). WB performed to assess protein level alterations revealed a parallel activation in complex IV, reflected by an increase in Cox Va subunit levels (Figure 3C).

DISCUSSION

Gelsolin, an actin-regulatory protein, exists both as an intracellular and extracellular protein [14], and is present in all nervous system cell types, including neurons [21] and choroid plexus [12]. Our findings indicate that secreted gelsolin is involved in the pathology of AD through the regulation of brain A β and its neurotoxic effects. Plasma gelsolin has been found to bind and reduce brain A β [15,17,18]. In the present study we had confirmed the formation of a complex between cytoplasmic and secreted gelsolin with A β , accordingly with previously published studies [15,22]. Our current results extend these observations, suggesting that megalin, an endocytic receptor involved in A β clearance [23-27] has a functional role in the formation of this complex. We show that megalin, binds A β /gelsolin complex in the choroid plexus epithelium, suggesting a role in clearance of A β from CSF to the blood. The latter is not surprising in view of megalin's ability to transport a large variety of proteins [28].

Abnormalities in cytoskeletal organization are a common feature of many neurodegenerative disorders, including AD. Interestingly, A β ₁₋₄₂-induced cytoskeletal alterations known to be associated with the proteolytic degradation of the tight junction-associated protein ZO-1 [10,11] were reversed after secreted gelsolin treatment, with relocation from the cytoplasm to the original position in the cell membrane of choroid plexus epithelial cells. In addition, our results suggest that the secretory form of gelsolin prevents the internalization of ZO-1 by blocking serine phosphorylation, as has been also demonstrated in other studies [29-31]. The presence of structures characterized by aggregates of polymerized actin (F-actin) has been described in AD [32]. Also, F-actin levels have been shown to increase in hippocampal neurons treated with A β [33]. Furthermore, cortical neurons expressing the APP intracellular domain suffer from pronounced changes in the organization of the actin cytoskeleton, including

destabilization of actin fibers [34]. We found that fibrillar A β ₁₋₄₂ also caused alterations in cytoskeletal actin in choroid plexus epithelial cells, as reflected by an increase in the F-actin content, and that gelsolin was able to protect against this effect. In this way, gelsolin contributes to the maintenance of the choroid plexus monolayer and the blood-CSF barrier integrity. A possible explanation for these effects could be that A β increases metalloproteinase 9 [35,36,11], which is capable of cleaving cytoplasmic gelsolin [37], thereby resulting in the destabilization of actin filaments and the disruption of tight junctions. Secreted gelsolin, which binds and sequesters A β , would then be able to prevent and diminish A β toxic effects.

On the other hand, our results also indicate that gelsolin prevents A β -induced cell death and NO production from choroid plexus cell cultures. Using several models of neuronal cell death, others studies have demonstrated that cytoplasmic gelsolin has anti-apoptotic properties that correlate with its dynamic actions on the cytoskeleton [38]. Indeed, gelsolin-null neurons have enhanced cell death [39], and increased vulnerability to glutamate toxicity [40]. In a previous study we reported that A β -induced mitochondrial dysfunction could ultimately activate a programmed cell death pathway in the choroid plexus epithelial cells [11]. In this study, we show that secreted gelsolin prevents A β -induced cell death by increasing enzyme activity of the respiratory chain complex IV in the choroid plexus epithelial cells. These observations are in line with other studies showing an A β -induced reduction of mitochondrial membrane potential by cytoplasmic gelsolin [41,42]. The intracellular form of gelsolin is associated to the mitochondrial membrane, where it can inhibit A β -induced loss of mitochondrial membrane potential, cytochrome c release, and regulate voltage-dependent channels [40,41]. Since extracellular gelsolin has also been detected in CSF, where its concentration is significantly altered in certain neurological conditions [43], this extracellular isoform of

gelsolin may well reduce choroid plexus A β -induced pathology in a similar manner to intracellular gelsolin [17,18].

In conclusion, our results demonstrate that secreted gelsolin can modulate A β -induced alterations in the blood-CSF barrier. We suggest that secreted gelsolin have a neuroprotective role against A β neurotoxicity. In summary, enhancement of gelsolin levels may represent a novel way to protect against A β neurotoxicity, and in the future, could be considered a potential therapeutic strategy for the treatment of patients with AD.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Fondo de Investigacion Sanitaria (FIS) (CP04/00179, PI060155) and Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña (2006.125), and (CP04/00011, PI050379) to CU. We thank Dr. Ximena Alvira for her editorial assistance.

REFERENCES

1. Selkoe, D.J., 1989, "The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease," *Ann. Med.*, 21, pp. 73-76.
2. Selkoe, D.J., 2000, "Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein," *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 924, pp. 17-25.
3. Knauer, M.F., et al., 1992, "Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 89, pp. 7437-7441.
4. Glabe, C., 2001, "Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease," *J. Mol. Neurosci.*, 17, pp. 137-145.
5. Dietrich, M.O., et al., 2008, "Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier," *Neurobiol. Aging*, 29, pp. 902-912.
6. Kalaria, R.N., 1999, "The blood-brain barrier and cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease," *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 893, pp. 113-125.
7. Miyakawa, T., et al., 2000, "Role of blood vessels in producing pathological changes in the brain with Alzheimer's disease," *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 903, pp. 46-54.
8. Deane, R., and Zlokovic, B.V., 2007, "Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease," *Curr. Alzheimer Res.*, 4, pp. 191-197.

9. Gonzalez-Velasquez, F.J., Kotarek, J.A., and Moss, M.A., 2008, "Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers," *J. Neurochem.*, 107(2), pp. 466-77.
10. Marco, S., and Skaper, S.D., 2006, "Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells," *Neurosci. Lett.*, 401(3), pp. 219-24.
11. Vargas, T., et al., 2008, "Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis," *Neurobiol. Aging*, Oct 4.
12. Matsumoto, N., et al., 2003, "Isolation of a set of genes expressed in the choroid plexus of the mouse using suppression subtractive hybridization," *Neuroscience*, 117, pp. 405-415.
13. Sun, H.Q., et al., 1999, "Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein," *J. Biol. Chem.*, 274, pp. 33179-33182.
14. Kwiatkowski, D.J., et al., 1986, "Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain," *Nature*, 323, pp. 455-458.
15. Chauhan, V.P., et al., 1999, "Binding of gelsolin, a secretory protein, to amyloid beta-protein," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 258, pp. 241-246.
16. Ray, I., et al., 2000, "Gelsolin inhibits the fibrillization of amyloid beta-protein, and also defibrillizes its preformed fibrils," *Brain Res.*, 853, pp. 344-351.

17. Matsuoka, Y., et al., 2003, "Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid," *J. Neurosci.*, 23, pp. 29-33.
18. Hirko, A.C., et al., 2007, "Peripheral transgene expression of plasma gelsolin reduces amyloid in transgenic mouse models of Alzheimer's disease," *Mol. Ther.*, 15, pp. 1623-1629.
19. Carro, E., et al., 2002, "Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels," *Nat. Med.*, 8, pp. 1390-1397.
20. Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., and Holt, I.J., 2002, "Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes," *Methods*, 26, pp. 327-334.
21. Stossel, T.P., 1990, "Actin-membrane interactions in eukaryotic mammalian cells," In: *Current topics in membranes and transport*. In: Hoffman, J.F., Giebisch, G., (Eds.), New York Academic Press, pp. 97-107.
22. Ji, L., Chauhan, A., and Chauhan, V., 2008, "Cytoplasmic gelsolin in pheochromocytoma-12 cells forms a complex with amyloid beta-protein," *Neuroreport*, 19, pp. 463-466.
23. Zlokovic, B.V., et al., 1996, "Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93, pp. 4229-4234.
24. Carro, E., et al., 2005, "Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I," *J. Neurosci.*, 25, pp. 10884-10893.

25. Deane, R., et al., 2004. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron*. 43, 333-344.
26. Hammad, S.M., et al., 1997, "Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide," *J. Biol. Chem.*, 272, pp. 18644-18649.
27. Zerbinatti, C.V., et al., 2004, "Increased soluble amyloid-beta peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101, pp. 1075-1080.
28. Christensen, E.I. and Birn, H., 2002, "Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors," *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3, pp. 256-266.
29. Ohtake, K., et al., "Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serine/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium," *Pharm. Res.*, 20(11), pp. 1838-1845.
30. Collins, N.T., et al., 2006, "Cyclic strain-mediated regulation of vascular endothelial occludin and ZO-1: influence on intercellular tight junction assembly and function," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26(1), pp. 62-68.
31. Rincon-Choles H, et al., "ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy," *Diabetes.*, 55(4), pp. 894-900.

32. Gibson, P.H., and Tomlinson, B.E., 1977, "Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease," *J. Neurol. Sci.*, 33(1-2), pp. 199-206.
33. Mendoza-Naranjo, A., Gonzalez-Billault, C., and Maccioni, R.B., 2007, "Abeta1-42 stimulates actin polymerization in hippocampal neurons through Rac1 and Cdc42 Rho GTPases," *J. Cell. Sci.*, 120(2), pp. 279-288.
34. Müller, T., et al., 2007, "Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)," *Mol. Biol. Cell.*, 18(1), 201-210.
35. Lee, J.M., et al., 2003, "Matrix metalloproteinase-9 and spontaneous hemorrhage in an animal model of cerebral amyloid angiopathy," *Ann. Neurol.*, 54(3), 379-382.
36. Talamagas, A.A., et al., "Abeta(1-40)-induced secretion of matrix metalloproteinase-9 results in sAPPalpha release by association with cell surface APP," *Neurobiol. Dis.*, 28(3), pp. 304-315.
37. Candiano G, et al., 2005, "Gelsolin secretion in interleukin-4-treated bronchial epithelia and in asthmatic airways," *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 72(9), pp. 1090-1096.
38. Harms, C., et al., 2004, "Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization," *Mol. Cell. Neurosci.*, 25(1), pp. 69-82.
39. Endres, M., et al., 1999, "Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke," *J. Clin. Invest.*, 103, pp. 347-354.

40. Furukawa, K., et al., 1997, "The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons," *J. Neurosci.*, 17, pp. 8178-8186.
41. Koya, R.C., et al., 2000, "Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release," *J. Biol. Chem.*, 275, pp. 15343-15349.
42. Qiao, H., et al., 2005, "Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin," *Neurobiol. Aging*, 26, pp. 849-855.
43. Kulakowska, A., et al., 2008, "Gelsolin concentration in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and other neurological disorders," *Eur. J. Neurol.*, 5(6), pp. 584-588.

FIGURE LEGENDS

Figure1. Gelsolin expression in choroid plexus epithelial cells. (a) Anti-megalin immunoprecipitation of rat choroid plexus cell extracts, followed by blotting with respective antibodies, revealed an association between megalin, endogenous gelsolin, the exogenously added secreted gelsolin form, and the exogenously added A β . Immunoprecipitation with nonspecific serum showed no unspecific A β association. Binding of gelsolin with exogenously added A β was also observed. Representative blots are shown (n=4). (b) Megalin colocalized with gelsolin and exogenously added A β in choroid plexus cultures. Confocal images also show gelsolin colocalization with A β . Scale bars=10 μ m. IP: Immunoprecipitation, NRS: normal rabbit serum.

Figure 2. Secreted gelsolin inhibits A β -induced disruption on choroid plexus epithelial cell cytoskeleton. (a) Representative confocal images of choroid plexus confluent monolayer labeled with anti-ZO-1 antibody. Under control conditions, ZO-1 immunostaining is distributed along the plasma membrane. In contrast, after exposure to A β_{1-42} for 48 hours, a disruption of the plasma membrane pattern of ZO-1 was observed, resulting in increased cytoplasmic localization. Note the ability of gelsolin treatment to prevent this A β -induced alteration in ZO-1 pattern. (n=3). (b) A β_{1-42} treatment resulted in increased serine phosphorylation of ZO-1 and decreased ZO-1 expression in choroid plexus epithelial cells. Gelsolin coadministration markedly attenuated A β_{1-42} alteration in ZO-1 (n=3). (c) BIODIPY® FL phalloidin staining of choroid plexus epithelial cells showed a disruption of the actin cytoskeleton after treatment with A β_{1-42} for 48 hours, and reversion when gelsolin was simultaneously added. Magnification: x40. Scale bars=10 μ m.

Figure 3. Secreted gelsolin expression modulates NO production and cell death in choroid plexus epithelial cells. (a) Choroid plexus epithelial cells treated with A β ₁₋₄₂ for 48 hours exhibited a significantly enhanced NO production compared with untreated cells. Secreted gelsolin coadministration completely blocked this effect (n=3); **p<0.01. (b) Increased cell death was observed in choroid plexus cell cultures 48 hours after A β ₁₋₄₂ treatment, and gelsolin addition totally reversed this toxic effect (n= 3); *p<0.05. (c) A β ₁₋₄₂ treatment reduced mitochondrial complex IV in-gel activity in choroid plexus epithelial cells, whereas secreted gelsolin administration increased complex IV activity, and reversed this decrease in A β ₁₋₄₂-induced activity. Blue native analysis of these culture samples, showed altered protein expression in the mitochondrial complex IV. Representative blue native blots and quantitative histograms are shown (n=4 per group); *p<0.05.

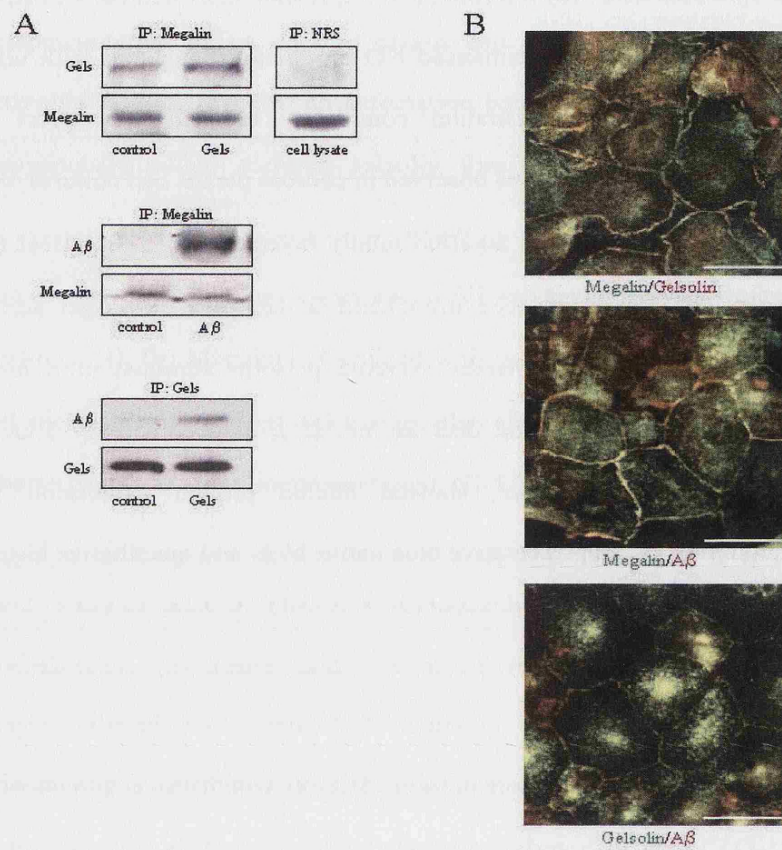


Figure 1

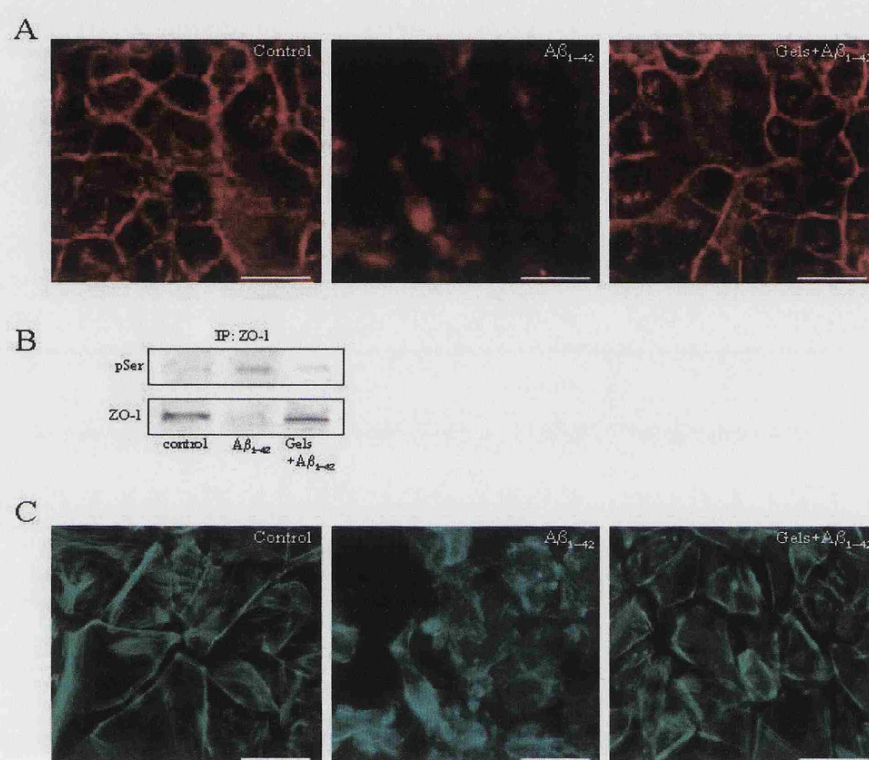


Figure 2

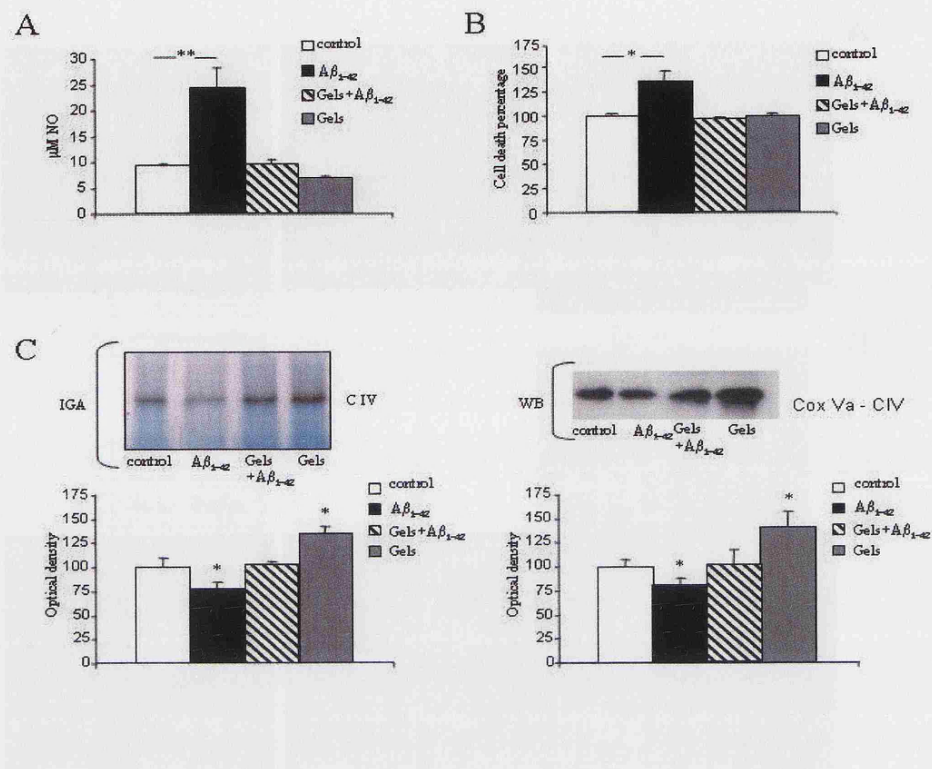


Figure 3

2. GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE β - AMILOIDE COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1. Polimorfismos en el gen *LRP2/Megalina*

[REDACTED]: Vargas T*, Bullido MJ*, Martínez-García A, Antequera D, Clarimón J, Rosich-Estrago M, Martín-Requero A, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Combarros O, Gómez-Isla T, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Carro E. “*A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer’s disease risk*”. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5. [Epub ahead of print]. *These authors have contributed equally to this work

Resumen

Aunque los pacientes con EA tienen niveles elevados de $A\beta$, solo una minoría muestra evidencias de un incremento en la producción de dicho péptido. Esta observación sugiere que muchos, quizás la mayoría de los casos de EA están asociados a un fallo en el aclaramiento de $A\beta$. El LRP2/megalina, un receptor que juega un importante papel en el proceso de aclaramiento de $A\beta$, es un firme candidato para la asociación genética con la EA. Para investigar esta hipótesis, analizamos el gen *LRP2/megalina* en una población de 2183 sujetos. El análisis genético indicó que el polimorfismo rs3755166 (G/A) localizado en el promotor del gen *LRP2/megalina*, está asociado a un riesgo a padecer la EA, de forma dependiente del genotipo ApoE. La frecuencia del genotipo AA para este polimorfismo, era significativamente más alta en pacientes con EA que en controles. Además, el ensayo de actividad luciferasa para este promotor, indicó que la variante A del promotor para este polimorfismo, está asociada con un 20% menos de actividad transcripcional que la variante G. Este estudio proporciona una fuerte evidencia de que este polimorfismo confiere un riesgo para la EA, y apoya el papel biológico del LRP2/megalina en el proceso neurodegenerativo de la EA.

RESEARCH ARTICLE

AMERICAN JOURNAL OF
medical genetics

A Megalin Polymorphism Associated With Promoter Activity and Alzheimer's Disease Risk

Teo Vargas,^{1,2} Maria Jesus Bullido,^{2,3} Ana Martinez-Garcia,^{2,3} Desiree Antequera,^{1,2} Jordi Clarimon,^{2,4} Marcel Rosich-Estrago,⁵ Angeles Martin-Requero,⁶ Ignacio Mateo,^{2,7} Eloy Rodriguez-Rodriguez,^{2,7} Elisabet Vilella-Cuadrada,⁵ Ana Frank,⁸ Alberto Lleo,^{2,4} Laura Molina-Porcel,⁴ Rafael Blesa,⁴ Onofre Combarros,^{2,7} Teresa Gomez-Isla,^{2,4} Felix Bermejo-Pareja,^{2,9} Fernando Valdivieso,^{2,3} and Eva Carro^{1,2*}

¹Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

²Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases Center (CIBERNED), Madrid, Spain

³Molecular Biology Department and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa [C.S.I.C.-U.A.M.], Madrid, Spain

⁴Memory Unit, Neurology Department, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

⁵Psychiatry and Medical Psychology Unit, School of Medicine and Health Sciences, Rovira and Virgili University, Reus, Spain

⁶Cellular and Molecular Pathophysiology Department, Centro de Investigaciones Biológicas [CSIC], Madrid, Spain

⁷Neurology Service, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

⁸Neurology Service, Hospital Universitario La Paz [UAM], Madrid, Spain

⁹Neurology Service, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

Received 29 May 2009; Accepted 3 November 2009

Elevated cerebral levels of amyloid beta-protein (A β) occur in Alzheimer's disease (AD), yet only a few patients show evidence of increased A β production. This observation suggests that many, perhaps most, cases of AD are caused by faulty clearance of A β . Megalin, which plays an important role in mediating A β clearance, is an attractive candidate gene for genetic association with AD. To investigate this hypothesis, we analyzed the megalin gene in a population of 2,183 subjects. Genetic analysis indicated that the rs3755166 (G/A) polymorphism located in the megalin promoter associated with risk for AD, dependently of apolipoprotein E genotype. The rs3755166 AA genotype frequency was significantly greater in AD patients than in control subjects. Furthermore, the luciferase reporter assay indicated that the rs3755166 A variant has 20% less transcriptional activity than the rs3755166 G variant. This study provides strong evidence that this megalin polymorphism confers a greater risk for AD, and supports a biological role for megalin in the neurodegenerative processes involved in AD. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

How to Cite this Article:

Vargas T, Bullido MJ, Martinez-Garcia A, Antequera D, Clarimon J, Rosich-Estrago M, Martin-Requero A, Mateo I, Rodriguez-Rodriguez E, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Combarros O, Gomez-Isla T, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Carro E. 2009. A Megalin Polymorphism Associated With Promoter Activity and Alzheimer's Disease Risk. *Am J Med Genet Part B* 999:1–8.

Grant sponsor: Fondo[®] de Investigación Sanitaria (FIS); Grant numbers: CP04/00179, PI060155; Grant sponsor: Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña; Grant number: 2006.125; Grant sponsor: CIBERNED; Grant sponsor: Obra Social Caja Madrid; Grant sponsor: Comunidad Autónoma de Madrid; Grant number: GR/SAL/0783/2004.

Disclosure statement: There are no actual or potential conflicts of interest with other people or organizations. Human studies were approved by the Ethics Committee of the Hospital '12 de Octubre', Hospital Clínico de San Carlos, and Hospital Universitario La Paz in Madrid (Spain), Hospital Santa Creu i Sant Pau in Barcelona (Spain), Hospital Universitario

Marqués de Valdecilla in Santander (Spain) and Institute Pere Mata in Reus (Spain), and informed consent was obtained from all patients prior to their participation.

Teo Vargas and Maria Jesus Bullido contributed equally to this work.

*Correspondence to:

Dr. Eva Carro, Ph.D., Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid 28041, Spain. E-mail: carroeva@h12o.es
Published online 00 month 2009 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)
DOI 10.1002/ajmg.b.31056

Key words: genetics; single nucleotide polymorphism; multi-ligand receptor; amyloid; transcriptional activity

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder. It is marked by progressive memory and cognitive ability loss. The etiology of AD is complex, embracing both environmental and genetic risk factors. To date, researchers have firmly established associations between four genes and AD risk: presenilin 1 (*PSEN1*), presenilin 2 (*PSEN2*), amyloid precursor protein (*APP*), and the apolipoprotein E (*APOE*) $\epsilon 4$ allele. Other genetic determinants have also been proposed as risk factors for sporadic forms of AD [Bertram et al., 2007].

It has been said that the major factor leading to increased brain levels of soluble amyloid- β (A β) in AD patients is increased tissue accumulation rather than A β overproduction [Selkoe, 2001]. Thus, a decreased clearance of A β , from the brain to the blood, could precipitate an AD phenotype and thus, might be an important pathogenic factor in this devastating disease. The latter process seems to involve megalin (also called low-density lipoprotein receptor-related protein-2 [LRP2]), an endocytic receptor expressed in numerous epithelia that belongs to the low-density lipoprotein (LDL) receptor family of multicargo receptors. Megalin, the best-studied member of this family, has been implicated in A β clearance and amyloidosis [Deane et al., 2004; Zerbini et al., 2004]. This receptor, besides being involved in the endocytic uptake of dozens of ligands [Christensen and Birn, 2002], also participates in A β clearance through the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier at the choroid plexus (CP) [Zlokovic et al., 1996; Hammad et al., 1997; Deane et al., 2004; Carro et al., 2005]. Megalin is also able to transcytose neurotrophic growth factors, including insulin-like growth factor I (IGF-I) [Carro et al., 2001, 2005] which itself participates in many neuroprotective actions in the brain [Carro et al., 2001, 2002; Trejo et al., 2001]. Furthermore, in the CP megalin expression and function reduce with ageing and AD [Carro et al., 2005; Dietrich et al., 2008], suggesting that a dysfunction in megalin pathway could represent an important risk factor in the pathogenesis of AD.

Other members of this LDL receptor superfamily have been proposed as genetic risk factors for sporadic AD, including LRP and LDLR [Bertram et al., 2007]. Although recent studies have described the presence of megalin mutations in patients with Donnai-Barrow syndrome [Kantarci et al., 2007], and have associated some of megalin polymorphisms with prostate cancer [Holt et al., 2008], to date there is no evidence supporting a role for megalin variability in the genetic susceptibility to AD. Thus, it was reasonable to examine the genetic variants of the megalin gene to further disentangle its role in the pathogenesis of sporadic AD.

In summary, since megalin is a strong candidate gene for AD, the goal of this study was to evaluate megalin polymorphisms in search for their association with this disease. In order to accomplish this, we performed a case-control genetic association study of megalin gene polymorphisms in a large cohort of Spanish patients with sporadic AD.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

The whole sample consisted of 2,183 individuals. These included 1,158 patients with sporadic AD (mean age at onset 73.7 ± 7.9 years; 66% women), representative of three geographic areas of Spain (Center, North-East, and North, see Table I), and recruited from the following health centers: Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain), Hospital La Paz (Madrid, Spain), Hospital Clínico de San Carlos (Madrid, Spain), Institute Pere Mata (Reus, Spain), Hospital Santa Creu i Sant Pau, (Barcelona, Spain), and Hospital Marqués de Valdecilla (Santander, Spain). AD patients were clinically diagnosed according to the criteria used by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) [McKhann et al., 1984] or to DSMIV [Wilson and Skodol, 1994] criteria. The control group consisted of 1,025 neurologically healthy individuals (mean age at evaluation 74.7 ± 11.8 years; 68% women) recruited through the same centers than the AD cases. All subjects gave their informed consent to participate in the study.

Genetic Association Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare[®]). Three megalin polymorphisms and one *LRP1* polymorphism were screened (Table I), using TaqMan SNP Genotyping Assays (C_11829258_10 for dbSNP rs3755166, C_16165996_10 for rs2075252, C_3017531_1_ for rs4668123, and C_1955081_10 for rs1799986) from Applied Biosystems[®], according to the manufacturer's instructions. Genotype calling was obtained with the SDS 2.1.1 software.

The megalin polymorphism rs4668123 was analyzed in a subsample (Center population, Table I), where it showed a significant linkage disequilibrium (LD) with rs2075252 (D' 0.999); consequently, only the rs2075252 genotyping was performed in the whole sample.

APOE genotyping ($\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ isoforms) was performed using FRET probes as previously described [Aslanidis and Schmitz, 1999], using 0.1 μ M probes in a reaction volume of 5 μ l; fluorescence measurement was fitted to an optimized genotyping protocol [Martinez-Garcia et al., 2004].

Sequencing of the Megalin Promoter

Systematic screening of megalin promoter was performed in 18 healthy controls and 17 AD patients with different rs3755166 genotypes (six controls and five patients were GG, six controls and six patients GA and six controls and six patients AA) using standard PCR and direct sequencing with the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (ABI PRISM, Applied Biosystems) in an ABI3730 automatic sequencer (Applied Biosystems). Primer sets covered the 1,635 bp sequence from -1118 to +517 (position +1 corresponding to the transcriptional start site (TSS), GenBank transcript id, NM_004525.2).

TABLE I. (A) Megalin and LRP1 Polymorphisms, and (B) Description of the Populations Composing the Case-Control Sample

SNP position (A)	NCBI SNP cluster ID	Nucleotide exchange	Amino acid exchange
<i>Megalin</i>			
Promoter	rs3755166	-759C/T	
Exon 66	rs2075252	A12493G	Lys4094Glu
Exon 46	rs4668123	G8827A	Ala2872Thr
<i>LRP1</i>			
Exon 3	rs1799986	C766T	Asp100Asp

(B)	n	Age	Females, %
Population			
Center (Madrid)			
Cases	339	71.5 ± 10.6	62
Controls	416	70.7 ± 13.9	62
North-East (Reus and Barcelona)			
Cases	484	75.5 ± 6.0	71
Controls	218	71.3 ± 8.2	53
North (Santander)			
Cases	335	72.7 ± 7.5	66
Controls	391	80.8 ± 7.8	68
Whole			
Cases	1158	73.7 ± 7.9	66
Controls	1025	74.7 ± 11.8	68

Promoter Activity Analysis by Transient Transfection

A fragment of megalin proximal promoter was obtained from genomic DNA of rs3755166 polymorphism homozygous (AA) individual. This was done using the GC-rich PCR System (Roche¹¹ Diagnostics, SL), according to the manufacturer's protocol, with the primers 5'-AAACAGCCCCCTTCTCACACA-3' (forward) and 5'-GGCTGCTTCTCAAGTTTGC-3' (reverse). The PCR product (1,635 bp, spanning from -1118 to +517 relative to the TSS, GenBank transcript id, NM_004525.2) was cloned into pGEM-T Easy plasmid vector by the TA-Cloning method (Promega Biotech, Iberica, SL), and subcloned into the promoterless pGL3 basic (Promega Biotech) vector upstream of the firefly luciferase gene, by digestion with *KpnI* and *SmaI*. The construction bearing the megalin [-759 G] promoter variant was then prepared by site-directed mutagenesis of the pGL3-LRP2 [-759 A] plasmid, with the "Site-directed Mutagenesis Kit" (Clontech, Takara Bio²⁵) and the primers 5'-agatgtggctgctgaataatgctaaagaaggatccaactc-3' (forward) and 5'-gaggttgatcctgttttagcaattatcagcaccacatct-3' (reverse). Resultant mutation was confirmed by DNA sequencing.

Cell Culture and Transient Transfection

Sheep CP (ATCC; Ref. CRL-1700) and HIT-22 (kindly provided by Adolfo Quiñones, Psychiatry Service, Hospital 12 de Octubre) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1% sodium pyruvate and 1% gentamicin. MDCK cells (ATCC; Ref. CRL-2285) were grown in DMEM containing 10% FBS and 1% gentamicin. To examine the formation of the monolayer in the sheep CP cell line, the expression of tight junction protein ZO-1 was evaluated using immunofluorescence [Carro et al., 2002] with a goat polyclonal anti-ZO-1 antisera (Santa Cruz¹²⁶ Biotechnology, Inc.). Megalin expression was also evaluated using a goat anti-megalin polyclonal antiserum (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Images were captured using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Both constructs of pGL3-megalin promoter, representing the two allelic variants of the megalin rs3755166 (G/A) polymorphism, were co-transfected with pSV-β-galactosidase to allow normalization for transfection efficiency. Eugene 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, SL), was used according to the manufacturer's specifications. Luciferase and β-galactosidase activities were determined 2 days after transfection, as previously described [Artiga et al., 1998]. Luciferase values were then normalized to β-galactosidase activity, and transcriptional activities of both constructs of the megalin promoter were expressed as relative luciferase/β-galactosidase activity. Results were compared using the Student's *t*-test.

Statistical Analysis

Two-tailed Pearson and Fisher exact tests were used to compare genotype or allele frequencies. Logistic regression models, used to

estimate the strength of the association between the genotypes and AD (expressed as the odds ratio [OR] and 95% confidence intervals [CI]) and the interaction between megalin and APOE, were adjusted by gender and by all the genotypes under study codified into dichotomous variables (see the tables' footnotes). All calculations were made using SPSS15.0 software. LD between markers was computed in control group using the program COCAPHASE from the UNPHASED software suite [Dudbridge, 2003].

RESULTS

Megalin Polymorphisms

As expected, the APOE $\epsilon 4$ allele frequency was higher in patients with AD than in control subjects (Table II).

We firstly analyzed a total of 823 patients affected by sporadic AD and 624 unrelated age- and sex-matched healthy control subjects from a clinically assessed case-control sample corresponding to the Center and North-East regions of Spain, and the analysis was extended to the North population (335 cases and 391 controls) for those single nucleotide polymorphisms (SNPs) showing asso-

ciation in the previous analysis. We evaluated three SNPs in the megalin gene region, selected because they were functional SNPs and belong to different HapMap linkage blocks, to determine whether they could represent a predisposing factor for AD. Since megalin and *LRP1* are functionally closely related, and they are the main receptors for A β transport across the blood-CSF barrier, and across blood-brain barrier (BBB) from brain to blood, respectively, as previously reported [Hammad et al., 1997; Deane et al., 2004; Zerbinatti et al., 2004; Carro et al., 2005; Deane et al., 2009], we also studied a *LRP1* promoter polymorphism, previously reported to be associated with AD [Bullido et al., 2000]. The results are shown in Table II.

Genotype distributions of the *LRP1* Asp100Asp (rs179986), megalin Lys4094Glu (rs2075252), and megalin Ala2872Thr (rs4668123) (not shown) polymorphisms were not different between cases and controls (Table II).

By contrast, we found a significant difference between affected and control subjects in the distribution of the megalin rs3755166 (G/A) polymorphism. The frequency of the AA genotype was 18% in AD patients, compared with 13% in control subjects (17% vs. 13%, 18% vs. 13%, and 16% vs. 14% in the Center, North-east, and

TABLE II. Megalin, LRP1 and APOE Genotype Distribution in the Case-Control Sample

		Megalin rs3755166 (G/A) ^b			χ^c	Crude odds ratio ^d		Adjusted odds ratio ^e	
	n ^a	GG	GA	AA		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Cases	1,158	0.37	0.46	0.17	0.05	1.30 [1.1–1.7]	0.03	1.3 [1.0–1.7]	0.05
Controls	1,025	0.37	0.49	0.13					

		Megalin Lys4094Glu rs2075252			χ^c	Crude odds ratio ^d		Adjusted odds ratio ^e	
	n ^a	GG	GA	AA		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Cases	804	0.61	0.34	0.05	ns	1.08 [0.9–1.2]	ns	1.2 [0.9–1.6]	ns
Controls	630	0.64	0.31	0.05					

		LRP1 Asp100Asp rs179986			χ^c	Crude odds ratio ^d		Adjusted odds ratio ^e	
	n ^a	TT	CT	CC		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Cases	746	0.02	0.23	0.75	ns	1.01 [0.9–1.1]	ns	1.1 [0.8–1.5]	ns
Controls	598	0.03	0.23	0.74					

		APOE number of $\epsilon 4$ alleles			χ^c	Crude odds ratio ^d		Adjusted odds ratio ^e	
	n ^a	0	1	2		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Cases	1,158	0.50	0.42	0.08	10^{-65}	5.2 [4.3–6.4]	10^{-14}	5.7 [4.6–7.0]	10^{-56}
Controls	1,025	0.84	0.15	0.01					

ns, no significant.

^aNumber of individuals. The differences among groups are due to "missed" genotypes. The SNPs rs2075252 and rs179986 were tested only in the "center" and "north-east" populations.

^bFigures represent the frequencies of each genotype. The SNPs are denoted by their dbSNPs reference codes.

^cSignificance for the differences in the genotype distributions (3 x 2 tables; χ^2 Pearson).

^dOR (95% CI) and the Fisher's exact test significance (P) for the following comparisons: Megalin rs3755166 AA versus any G; megalin [Lys4094Glu] any A versus GG; LRP1 [Asp100Asp] any T versus CC and APOE any 4 versus no 4.

^eOR (95% CI) and statistical significance (P) for the same comparisons described above, obtained from a logistic regression model which included, as independent variables, all the genotypes shown in the table plus gender.

North populations, respectively, data not shown). A logistic regression analysis including all the variables reported in the study (*APOE*, *LRP1* and megalin genotypes, and gender), demonstrated that the risk associated with the AA genotype remained statistically significant, suggesting that this genetic variation can be considered a real risk factor, being recessive the effect of the A allele.

To check other possible polymorphisms in megalin promoter, which could be responsible for the observed association, we sequenced a 1,623 bp fragment of the megalin gene comprising the promoter, in 35 individuals genotyped for the rs3755166 SNP. We confirmed this rs3755166 genotype. Additionally, for rs6711662 and rs16856847 in the promoter, we only found the ancestral allele. The same was true for rs1559014 in exon 1 and rs1559013 in intron 1, whereas we found the two allelic forms for the intron 1 SNPs rs2161038 and rs3815680. Thus, our findings suggest that the observed association was not due to linkage of rs3755166 with other polymorphisms in the megalin proximal promoter.

In order to determine whether the risk variation for megalin rs3755166 (G/A) polymorphism-associated AD was dependent on the risk conferred by the *APOE* ϵ 4 allele, the sample was stratified according to the absence or presence of the *APOE* ϵ 4 allele (Table III). The AA genotype was associated with an increased risk of AD in individuals bearing no *APOE* ϵ 4 alleles, indicating that the effect of the megalin rs3755166 (G/A) polymorphism does not depend on the presence of *ApoE* ϵ 4. Nevertheless, an interaction between *APOE* ϵ 4 and megalin rs3755166 (G/A) polymorphism can not be ruled out, since a logistic regression model including an interaction term between *APOE* ϵ 4 and megalin, showed that the contribution of the interaction term to the model was high (B exponent 2.4) and significant ($P = 0.009$); these results suggest that *APOE* and megalin interact in terms of AD genetic association, with the risk associated to megalin polymorphism being significant only in the individuals devoid of the *APOE* ϵ 4 allele. On the contrary, we did not detect significant interactions between megalin and *LRP1*.

In summary, our data suggest that the rs3755166 (G/A) polymorphism in the megalin promoter is associated with AD, and that this association is more evident in the absence of the *APOE* ϵ 4 allele.

Functional Assay of Megalin Promoter

Since the rs3755166 (G/A) polymorphism is located within the megalin promoter, we examined the effect of this polymorphism in the promoter's activity using a luciferase-based transient transfection system employed in previous studies [Garcia et al., 1996; Artiga et al., 1998; Bullido et al., 1998]. Promoter activity has been studied in sheep CP cells, which resemble the blood-CF barrier cells, where megalin is highly expressed and involved in $A\beta$ clearance from the brain to the blood circulation [Hammad et al., 1997; Chun et al., 1999; Deane et al., 2004; Zerbiniatti et al., 2004]. Confocal microscopy showed that the epithelial monolayer formed by sheep CP cells and stained with peri-plasma membrane tight junction-associated protein ZO-1, also expressed endogenous megalin (Fig. 1A).

Transcriptional activity of the rs3755166 A allele decreased in sheep CP cell lines by 23% (Fig. 1B), in MDCK by 25% (Fig. 1C), and in HT-22 by 18% (Fig. 1D), compared with the rs3755166 G allele, suggesting that the presence of the rs3755166 (G/A) polymorphism, which confers an increased risk for AD according with our results, is associated with decreased constitutive levels of megalin promoter's activity.

DISCUSSION

To date, many researchers in the scientific community have warmed to the hypothesis that $A\beta$ accumulation in the cerebral cortex constitutes a major threat to neuronal function. Although the amyloid hypothesis in the development of AD still remains, the number of genetic, biochemical, and animal model studies supporting its validity is impressive and growing apace [Selkoe, 2001]. While the field has focused enormously on the complex mechanisms of $A\beta$ production, including the role of the β - and γ secretases, which generate $A\beta$ from its precursor protein, the APP, an increase in $A\beta$ production currently explains a minority of cases, specifically those bearing inherited mutations in APP or presenilins 1 or 2. This fact opens the possibility that many, perhaps most, cases of AD are caused by a faulty clearance of $A\beta$, a peptide that is

TABLE III. Association of Megalin rs3755166 Polymorphism With AD in ApoE4 Stratified Samples

		Megalin rs3755166 (G/A) ^b				Crude odds ratio ^d		Adjusted odds ratio ^e		
Test sample		n ^a	GG	GA	AA	χ ^c	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
APOE										
No E4 alleles										
Cases	574	0.37	0.46	0.17	0.06	1.38 {1.1–1.9}	0.03	1.41 {1.1–1.9}	0.03	
Controls	864	0.38	0.49	0.13						
At least one E4 allele										
Cases	584	0.38	0.46	0.16	ns	1.01 {0.6–1.6}	ns	1.06 {0.7–1.7}	ns	
Controls	161	0.34	0.50	0.16						

ns, no significant.

^aNumber of individuals.

^bFigures represent the frequencies of each genotype.

^cSignificance for the differences in the genotype distributions (3 × 2 tables; χ^2 Pearson).

^dOR (95% CI) and the Fisher's exact test significance (P) for the megalin rs3755166 AA versus any G.

^eOR (95% CI) and statistical significance (P) for the same comparison described above, obtained from a logistic regression model that included gender as an independent variable.

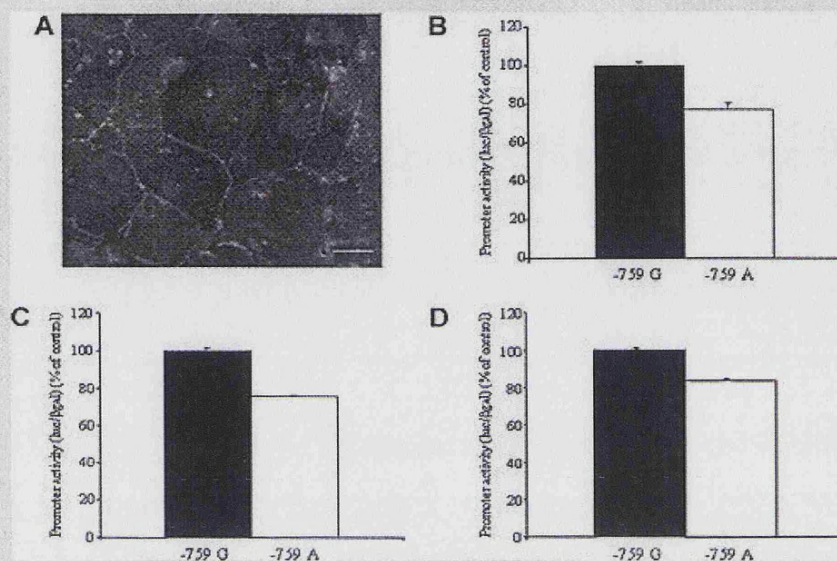


FIG. 1. Transcriptional activity of the megalin rs3755166 (G/A) allelic variants. A: Merged confocal image of sheep choroid plexus epithelial monolayer stained with tight junction protein ZO-1 (green) and megalin (red). Magnification: 40 \times . Scale bar = 10 μ m. Transcriptional activity of the megalin promoter was reduced for the A allele of the rs3755166 (G/A) polymorphism in (B) sheep choroid plexus cells, (C) MDCK cells, and (D) HT-22 cells. Values are the mean \pm standard error of the mean (SEM) of three triplicate determinations.

produced at normal levels throughout life [Selkoe, 2001]. Remarkably, the mechanisms of A β clearance have received little attention, but fortunately, that is starting to change.

Megalin, a multifunctional protein involved in cellular signaling and receptor-mediated endocytosis [Gotthardt et al., 2000; Christensen and Birn, 2002], may contribute to neurological conditions such as AD by virtue of its ability to endocytose apolipoproteins APOJ, APOE and other A β carriers [Moestrup and Verroust, 2001; Christensen and Birn, 2002]. This latter has been reinforced by very recent findings that identify APOJ (also known as clusterin) variants associated with AD [Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009]. Megalin may be essential for neuro-surveillance, which includes brain A β clearance [Hammad et al., 1997; Deane et al., 2004; Zerbinatti et al., 2004] and transport of neurotrophic growth factors such as insulin [Orlando et al., 1998] or IGF-I [Carro et al., 2005]. These data argue in favor of a crucial role for megalin in neuroprotection, and suggest that megalin dysfunction might be involved in the pathogenesis of sporadic AD. This latter idea is reinforced by the fact that megalin reduces with ageing [Carro et al., 2005; Dietrich et al., 2008], which, in turn, is the major risk factor in AD.

With this in mind, we set out to test whether genetic variability of megalin could represent a risk factor for AD. To our knowledge, the current study is the first to describe a significant association between megalin polymorphisms and the risk for developing AD. Homozygosity for the A allele of the rs3755166 (G/A) polymorphism was associated with an increased risk for AD. These results

are significant for several reasons. First, an association between megalin polymorphisms and AD suggest a new genetic link between AD, A β brain levels, and megalin. Second, these studies help to identify new genetic AD risk factors which could aid in diagnosis of AD patients. Moreover, these results may lead to the discovery of novel mechanisms underlying AD, and thereby suggest new therapeutic approaches.

In recent years, substantial evidence has confirmed that variants in the promoter of certain genes may underlie the pathogenesis of several neurological diseases, including Parkinson's disease [Wang et al., 2006], Huntington's disease [Coles et al., 1998], and AD [Fallin et al., 2001; Heijmans et al., 2002]. Very recent studies provide strong evidence that an APP promoter polymorphism, which has a higher transcriptional activity, over-expresses APP [Lv et al., 2008]. To further elucidate the association between the megalin promoter polymorphism with AD, we performed functional analyses in neuronal and non-neuronal cell lines. In the luciferase assay, the transcriptional activity of the A allele was reduced by 20% compared with the G allele of the rs3755166 (G/A) polymorphism in sheep CP cell lines. This suggests that a megalin promoter carrying the rs3755166 A variant may hold less transcriptional activity and thus under-express megalin, thereby playing a crucial role in the development of AD.

Because the megalin-associated risk observed here was dependent of APOE ϵ 4 status (APOE ϵ 4 non-carriers), we speculate that it could be a compensatory mechanism, since APOE, which binds A β peptides in senile plaques [Horsburgh et al., 2000; Thal et al., 2005]

and promotes A β proteolytic degradation and clearance [Jiang et al., 2008], is known to bind to megalin [Veinbergs et al., 2001]. APOE $\epsilon 4$, which is associated with an increased risk for AD, is proportional to the reduction in APOE levels in the hippocampus and frontal cortex seen in AD subjects [Bertrand et al., 1995], and, according to our data, is not associated with the polymorphism in the megalin promoter.

However, in APOE $\epsilon 4$ non-carriers, this megalin variant, which has a lower transcriptional activity, is more frequent in AD subjects, and it could be associated with low megalin expression. In support of this hypothesis, studies have described that APOE is up-regulated after an acute brain injury [Page et al., 1998; Aoki et al., 2003], enclosed to down-regulation of LRP [Marzolo et al., 2000] and megalin expression (unpublished data).

In summary, our analysis of the megalin promoter polymorphism strongly suggests that the presence of the rs3755166 (G/A) polymorphism may lead to important changes in megalin expression, in this way contributing to the development of AD. This effect could potentially magnify brain A β accumulation, accelerating the course of AD. In conclusion, the megalin gene can be considered a new AD risk factor in our study population.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (CP04/00179, PI060155), Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña (2006.125), CIBERNED, Obra Social Caja Madrid, Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0783/2004). We thank Drs. P. Gil, P. Coria, and A. Labad-Alquézar for their cooperation in the generation of the case-control samples. We are grateful to the *Asociación de Familiares de Alzheimer de Madrid (AFAL)* for continuous encouragement and help. This work was made possible by the generous participation of the patients, the control subjects, and their families. Finally, we thank Ximena Alvira-Botero for the careful revision of this manuscript.

REFERENCES

- Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, Wakayama Y. 2003. Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke* 34:875–880.
- Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, García MA, Aldudo J, Vazquez J, Valdivieso F. 1998. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett* 421:105–108.
- Aslanidis C, Schmitz G. 1999. High-speed apolipoprotein E genotyping and apolipoprotein B3500 mutation detection using real-time fluorescence PCR and melting curves. *Clin Chem* 45:1094–1097.
- Bertram E, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. 2007. Systematic meta analyses of Alzheimer disease genetic association studies: The AlzGene database. *Nat Genet* 39:17–23.
- Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM. 1995. Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res* 33:174–178.
- Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, García MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. 1998. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* 18:69–71.
- Bullido MJ, Guallar-Castillon P, Artiga MJ, Ramos MC, Sastre I, Aldudo J, Frank A, Coria F, Rodríguez-Artalejo F, Valdivieso F. 2000. Alzheimer's risk associated with human apolipoprotein E, alpha-2 macroglobulin and lipoprotein receptor related protein polymorphisms: Absence of genetic interactions, and modulation by gender. *Neurosci Lett* 289:213–216.
- Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres Aleman I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci* 21:5678–5684.
- Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. 2002. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 8:1390–1397.
- Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I. 2005. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin like growth factor I. *J Neurosci* 25:10884–10893.
- Christensen EI, Birn H. 2002. Megalin and cubilin: Multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:256–266.
- Chun JT, Wang L, Pasinetti GM, Finch CE, Zlokovic BV. 1999. Glycoprotein 330/megalin (LRP 2) has low prevalence as mRNA and protein in brain microvessels and choroid plexus. *Exp Neurol* 157:194–201.
- Coles R, Caswell R, Rubinsztein DC. 1998. Functional analysis of the Huntington's disease (HD) gene promoter. *Hum Mol Genet* 7:791–800.
- Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV. 2004. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of A β isoforms. *Neuron* 43:333–344.
- Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV. 2009. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8:16–30.
- Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yébenes JG, Molina JA, Bermejo F, Carro E. 2008. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging* 29:902–912.
- Dudbridge F. 2003. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25:115–121.
- Fallin D, Cohen A, Essioux L, Chumakov I, Blumenfeld M, Cohen D, Schork NJ. 2001. Genetic analysis of case/control data using estimated haplotype frequencies: Application to APOE locus variation and Alzheimer's disease. *Genome Res* 11:143–151.
- García MA, Vazquez J, Gimenez C, Valdivieso F, Zafra E. 1996. Transcription factor AP-2 regulates human apolipoprotein E gene expression in astrocytoma cells. *J Neurosci* 16:7550–7556.
- Gotthardt M, Tronmsdorf M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J, Herz J. 2000. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem* 275:25616–25624.
- Hamud SM, Ranganathan S, Loukinova E, Tsal WO, Argraves WS. 1997. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* 272:18644–18649.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvin V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, van den Bussche H, Heuser I,

- Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. Sep 6.
- Heijmans BT, Slagboom PE, Gussekloo J, Droog S, Lagaay AM, Kluit C, Knook DL, Westendorp RG. 2002. Association of APOE epsilon2/epsilon3/epsilon4 and promoter gene variants with dementia but not cardiovascular mortality in old age. *Am J Med Genet* 107:201–208.
- Holt SK, Karyadi DM, Kwon EM, Stanford JL, Nelson PS, Ostrander EA. 2008. Association of megalin genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *Clin Cancer Res* 14:3823–3831.
- Horsburgh K, Cole GM, Yang F, Savage M, Greenberg BD, Gentleman SM, Graham DI, Nicoll JA. 2000. beta-amyloid (Abeta)42(43), abeta42, abeta40 and apoE immunostaining of plaques in fatal head injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26:124–132.
- Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Wilson TM, Collins JL, Richardson JC, Smith JD, Comery TA, Riddell D, Holtzman DM, Tontonoz P, Landreth GE. 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58:681–693.
- Kantarci S, Al-Gazali L, Hill RS, Donnai D, Black GC, Bieth E, Chassaing N, Iacombe D, Devriendt K, Teebi A, Loscertales M, Robson C, Liu T, MacLaughlin DT, Noonan KM, Russell MK, Walsh CA, Donahoe PK, Pober BR. 2007. Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet* 39:957–959.
- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O, the European Alzheimer's Disease Initiative Investigators, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossu P, Piccardi P, Annoni G, Scipia D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. Sep 6.
- Ly H, Jia L, Jia J. 2008. Promoter polymorphisms which modulate APP expression may increase susceptibility to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 29:194–202.
- Martinez-Garcia A, Sastre I, Tenorio R, Bullido MJ. 2004. SNP genotyping with FRET probes. Optimizing the resolution of heterozygotes. *Mol Cell Probes* 18:211–214.
- Marzolo MP, von Bernhardt R, Bu G, Inestrosa NC. 2000. Expression of alpha(2)-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in rat microglial cells. *J Neurosci Res* 60:401–411.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939–944.
- Moestrup SK, Verroust PJ. 2001. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr* 21:407–428.
- Orlando RA, Rader K, Authier F, Yamazaki H, Posner BI, Bergeron JJ, Farquhar MG. 1998. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol* 9:1759–1766.
- Page KJ, Hollister RD, Hyman BT. 1998. Dissociation of apolipoprotein and apolipoprotein receptor response to lesion in the rat brain: An in situ hybridization study. *Neuroscience* 85:1161–1171.
- Selkoe DJ. 2001. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32:177–180.
- Thal DR, Capetillo-Zarate E, Schultz C, Rub U, Saido TC, Yamaguchi H, Haass C, Griffin WS, Del Tredici K, Braak H, Ghebremedhin E. 2005. Apolipoprotein E co-localizes with newly formed amyloid beta-protein (Abeta) deposits lacking immunoreactivity against N-terminal epitopes of Abeta in a genotype-dependent manner. *Acta Neuropathol* 110:459–471.
- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 21:1628–1634.
- Veinbergs I, Van Uden E, Mallory M, Alford M, McGiffert C, DeTeresa R, Orlando R, Masliah E. 2001. Role of apolipoprotein E receptors in regulating the differential in vivo neurotrophic effects of apolipoprotein E. *Exp Neurol* 170:15–26.
- Wang CK, Chen CM, Chang CY, Chiang KH, Chen IC, Li ML, Lee-Chen GJ, Wu YR. 2006. alpha-Synuclein promoter RsaI T-to-C polymorphism and the risk of Parkinson's disease. *J Neural Transm* 113:1425–1433.
- Wilson HS, Skodol A. 1994. Special report: DSM-IV: Overview and examination of major changes. *Arch Psychiatr Nurs* 8:340–347.
- Zerbinatti CV, Wozniak DF, Cirrito J, Cam JA, Osaka H, Bales KR, Zhuo M, Paul SM, Holtzman DM, Bu G. 2004. Increased soluble amyloid-beta peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1075–1080.
- Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, Frangione B, Ghiso J. 1996. Glycoprotein 330/megalin: Probable role in receptor mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4229–4234.

2.2. Polimorfismos en los genes *GSN* y *TTR*

2.3. Polimorfismos en el gen *IGF-I*

■: Vargas T*, Martínez-García A*, Antequera D, Vilella-Cuadrada E, Clarimón J, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Frank A, Rosich-Estrago M, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Gómez-Isla T, Combarros O, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Bullido MJ, Carro E. ***“IGF-I gene variability is associated with an increased risk for AD”***. Annals of Neurology. *These authors have contributed equally to this work

Resumen

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), un factor neuroprotector fisiológicamente relevante con un amplio espectro de acciones en el cerebro adulto, está involucrado en la patogénesis de la EA. Los niveles circulantes de IGF-I, alterados en pacientes con EA, están involucrados en el aclaramiento cerebral de complejos de A β . Sin embargo, todavía no se ha determinado si existe una asociación genética entre el gen *IGF-I* y la EA. Para investigar esta hipótesis, analizamos varios polimorfismos en el gen *IGF-I* en una población de 2287 sujetos. El análisis genético indicó que los pacientes con EA tenían diferentes distribuciones genotípicas para el polimorfismo rs972936 comparadas con las de los sujetos sanos. La frecuencia del genotipo CC para el polimorfismo rs972936, estaba significativamente aumentada en pacientes con EA comparada con la de los controles (64% frente a 55%). Este genotipo estaba asociado a un incremento en el riesgo de padecer EA, independientemente del genotipo ApoE. Además, este genotipo estaba asociado con un incremento en los niveles circulantes de IGF-I. Estos resultados sugieren que este polimorfismo en el gen *IGF-I* confiere un mayor riesgo para la EA y confirman el papel fisiológico del IGF-I en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, y particularmente en la EA.

***IGF-I* gene variability is associated with an increased risk for AD**

Teo Vargas^{1,2*}, Ana Martinez-Garcia, PhD^{2,3*}, Desiree Antequera^{1,2}, Elisabet Vilella-Cuadrada, PhD⁴, Jordi Clarimon, PhD^{2,5}, Ignacio Mateo, MD, PhD^{2,6}, Eloy Rodriguez-Rodriguez, MD, PhD^{2,6}, Ana Frank, MD⁷, Marcel Rosich-Estrago, MD⁴, Alberto Lleo, MD, PhD^{2,5}, Laura Molina-Porcel, MD, PhD⁵, Rafael Blesa, MD, PhD⁵, Teresa Gomez-Isla, MD, PhD^{2,5}, Onofre Combarros, MD, PhD^{2,6}, Felix Bermejo-Pareja, MD, PhD^{2,8}, Fernando Valdivieso, PhD^{2,3}, Maria Jesus Bullido, PhD^{2,3}, Eva Carro, PhD^{1,2}

¹Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

²Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases Center (CIBERNED), Madrid, Spain

³Molecular Biology Department and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.), Madrid, Spain

⁴Psychiatry and Medical Psychology Unit, School of Medicine and Health Sciences, Rovira and Virgili University, Reus, Spain

⁵Memory Unit, Neurology Department, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

⁶Neurology Service, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain.

⁷Neurology Service, Hospital Universitario La Paz (UAM), Madrid, Spain

⁸Neurology Service, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

Corresponding author:

Eva Carro, PhD

Neuroscience Laboratory, Research Center,

Hospital 12 de Octubre,

Avda. de Córdoba, s/n

Madrid, 28041. Spain.

Phone: +34-913908765

Fax: +34-913908544

E-mail: carroeva@h12o.es / carroeva@h12o.es

*These authors have contributed equally to this work

Running title: IGF-I polymorphisms and Alzheimer's disease

Abstract

OBJECTIVE: Insulin-like growth factor I (IGF-I), a physiologically relevant neuroprotective factor with a wide spectrum of actions in the adult brain, is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Circulating levels of IGF-I change in AD patients and are implicated in the clearance of brain amyloid beta (A β) complexes. However, whether a genetic association between *IGF-I* and AD exists has not been determined yet. **METHODS:** To investigate this hypothesis, we screened the *IGF-I* gene for various well-known single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in a population of 2287 individuals. **RESULTS:** Genetic analysis indicated different distribution of one SNP in the AD population compared with healthy control subjects. In particular, the frequency of rs972936 CC genotype was significantly greater in AD patients than in control subjects (64% vs 55%). The rs972936 CC genotype was associated with an increased risk for disease, independently of apolipoprotein E genotype, and enhanced circulating levels of IGF-I. **INTERPRETATION:** These findings suggest that polymorphisms within the *IGF-I* gene confer greater risk for AD, and confirm the physiological role IGF-I in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, and, in particular, in AD.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent neurodegenerative disorder. It is clinically characterized by progressive memory loss and cognitive function deterioration. Anatomically, the main pathological features of AD are massive neuronal loss, presence of intracellular tangles, and extracellular senile plaque deposition, whose major constituent is amyloid β ($A\beta$).¹⁻³ The etiology of AD is complex, involving both environmental and genetic risk factors. To date, researchers have firmly established associations between four genes and AD risk: Presenilin 1 (*PSEN1*), Presenilin 2 (*PSEN2*), amyloid precursor protein (*APP*), and the apolipoprotein E (*APOE*) $\epsilon 4$ allele. However, other genetic determinants have also been proposed as risk factors for sporadic forms of AD.⁴

There is increasing evidence that insulin-like growth factor I (IGF-I), a widely potent neuroprotective hormone, has a central role in the pathogenesis of many neurodegenerative disorders, including AD. IGF-I protects against $A\beta$ toxicity,⁵ and influences other AD traits, such as the rate of tau phosphorylation in neurons, by inhibiting the tau kinase glycogen synthase kinase-3 (GSK-3).⁶ Indeed, impaired IGF-I/insulin signalling in mouse brain leads to the appearance of hyperphosphorylated tau (Hpf-tau) and cognitive loss,⁷⁻⁹ whereas treatment with systemic IGF-I ameliorates amyloidosis and cognitive derangement in mouse models of AD.¹⁰ A direct link between serum IGF-I and brain amyloidosis was established by previous work showing a potential physiological role of IGF-I in $A\beta$ clearance from the brain.¹¹ Studies published during the last years have described an inverse relationship between circulating IGF-I levels and AD.¹²⁻¹⁶ Moreover, serum IGF-I may enter the brain by crossing the choroid plexus barrier via megalin,¹⁷ an endocytic receptor recently associated with an increased risk for AD.¹⁸

RESULTADOS

Several studies have analysed association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and circulating levels of IGF1, and risk of breast cancer.¹⁹⁻²⁴ *IGF-I* receptor polymorphisms may alter the function of this receptor and, secondary, may alter cerebral and systemic levels of IGF-I in patients with vascular dementia.²⁵ However, although a few studies have been reported,^{4,26,27,28} there is no clear evidence supporting a role of *IGF-I* variability in the genetic susceptibility to AD.

Blood-borne IGF-I stimulates the entrance and production of different proteins involved in A β transport, such as albumin and transthyretin (Ttr) through the brain-cerebrospinal fluid (CSF) barrier in the choroid plexus epithelium, which eventually enhances its brain efflux.^{10,11} Ttr is known as a wide-spectrum carrier protein involved in the transport of retinol, thyroid hormone and A β .²⁹ Mutations in this protein underlie vascular amyloidosis,³⁰⁻³² a metabolic disease leading to polyneuropathy and vascular derangements. Another A β binding protein is Gelsolin (Gsn), which is expressed in a large variety of brain cells including choroid plexus epithelial cells.³³ Increasing evidence supports the role of Gsn in neuronal survival and protection against A β toxicity,³³⁻³⁸ and mutations in the *GSN* gene have been associated with systemic amyloidosis.^{39,40}

Nevertheless, there is no clear evidence supporting a role of *IGF-I*, *GSN* or *TTR* variability in the genetic susceptibility to AD. To test this hypothesis, we performed a case-control genetic association study of *IGF-I*, *GSN*, and *TTR* gene polymorphisms in a large cohort of Spanish patients affected by sporadic forms of AD. Additionally, serum IGF-I concentrations were measured to verify the influence of specific *IGF-I* polymorphisms on circulating levels of IGF-I in AD patients.

Subjects and Methods

The study sample consisted of 2287 individuals representative of three geographic areas of Spain (Centre, North and North-East), recruited from the following health centers: Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain), Hospital La Paz (Madrid, Spain), Hospital Clínico de San Carlos (Madrid, Spain), Hospital Santa Creu i Sant Pau, (Barcelona, Spain), Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain), and the Institute Pere Mata (Reus, Spain). It included 1249 patients diagnosed with sporadic AD (mean age at onset 76.4 ± 8.2 years; 66% women), and 1103 neurologically healthy individuals (mean age at evaluation 74.8 ± 11.6 years; 62% women) as control group. AD patients were clinically diagnosed based on criteria by the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA),⁴¹ or the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM IV) (Wilson et al., 1994).⁴² All subjects gave their informed consent to participate in the study.

Genetic analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). DNA samples were genotyped for 10 selected single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in three different genes implicated in A β clearance and amyloidosis: *IGF-I*, *GSN*, and *TTR* (Table 1). All SNPs were screened using TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems™). Genotype calling was obtained with the SDS 2.1.1 software (Sequence Detection Software; Applied Biosystems™). Haplotype blocks in each gene, as well as haplotype tagging SNPs (htSNPs) representing the majority of common genetic variations across each gene locus, were evaluated using Haploview v 4.1 (Broad Institute of MIT and Harvard). Allele frequency and location for each SNP were based on GenBank (National Center

RESULTADOS

for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health). *APOE* genotyping ($\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ isoforms) was performed using FRET probes as described previously.⁴³

Measurement of serum IGF-I levels

To determine serum IGF-I levels, we collected blood samples from 89 patients with sporadic AD and 125 healthy control subjects recruited from the Neurology Service of the Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain) and Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, Spain). Blood samples were centrifuged for 5 minutes at 2500g and aliquoted serum was stored at -20°C until analysis. Quantitative determination of serum IGF-I was performed in the Biochemistry Service of Hospital 12 de Octubre (Madrid, Spain) using IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)

Statistical Analysis

Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was calculated in the control population using Pearson's χ^2 statistics. Two-tailed Pearson and Fisher exact tests were used to compare genotype or allele frequencies between cases and controls. Logistic regression models, expressed as odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were used to estimate the strength of the association between genotypes and AD and the interaction between selected SNPs and *APOE*. Results were adjusted by gender and by all the genotypes under study codified into dichotomous variables (see the tables' footnotes). To estimate haplotypes from population genotype data, we used the PHASE v 2.1 software.^{44,45} Linkage disequilibrium among SNPs was analyzed with the EMLD computer software. The Mann-Whitney U test and Pearson correlations were used when appropriate. All calculations were made using SPSS v15.0 software. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Overall, 1249 patients diagnosed with sporadic AD and 1065 unrelated age- and sex-matched healthy control subjects were included in the study. As expected, the frequency of the *APOE* ϵ 4 allele was higher in patients with AD than in control subjects (Table 2). We evaluated four SNPs in the *IGF-I* gene region (Table 1), representing 53% of the variability of the gene, and selected because they were functional SNPs and belong to different HapMap linkage blocks, to determine whether they could represent a predisposing factor for AD. We found no strong linkage disequilibrium among the four SNPs studied, although rs972936 and rs5742629 were partially linked (D' 0.56; r^2 0.34). The *IGF-I* rs35767 polymorphism, located in the promoter region, was chosen because it has been linked with variations in plasma IGF-I levels.²² Genotype distribution of this polymorphism was unchanged in AD patients compared with controls subjects (Table 2). This was also true for rs6214 polymorphism. The rs5742629 polymorphism showed a trend for association. This was possibly due to its partial linkage with rs972936, since we found a significant difference in the distribution of the *IGF-I* rs972936 (C/T) polymorphism between AD patients and control subjects ($p = 0.007$; Table 2). Specifically, the frequency of the CC genotype was 63% in AD patients and 55% in control subjects (odds ratio 1.3; 95% CI 1.1-1.5). We also explored the influence of the age of AD onset, and we observed the risk of carrying the rs972936 CC genotype was greater at advanced ages (odds ratio 2.0; 95% CI 1.2-2.9) in individuals older than 84 years (data not shown).

When we evaluated the additive interaction among the four *IGF-I* polymorphisms, we did not observe differences in the distribution of the genotype combinations between AD patients and control subjects, except for the biallelic haplotypes derived from the two intronic SNPs rs97293 and rs5742629. Specifically, the CT haplotype was associated with risk (OR 1.4, p 0.03) compared with the TC haplotype.

RESULTADOS

In order to determine whether the risk variation for the *IGF-I* rs972936 (C/T) polymorphism-associated AD was dependent on the risk conferred by the *APOE* ϵ 4 allele, the sample was stratified according to the absence or presence of the *APOE* ϵ 4 allele, or an interaction term was included in the logistic regression analysis. We found no evidence of an interaction between the *APOE* ϵ 4 allele and the *IGF-I* rs972936 (C/T) polymorphism.

To assess the biological relevance of the *IGF-I* rs972936 (C/T) polymorphism, and since this SNP has a strong linkage disequilibrium with the rs1520220 (with $R_p^2 > 0.85$ ²¹) that has been associated with higher circulating levels of IGF-I,²¹ we measured serum IGF-I levels in 88 AD patients and 121 control subjects. Initially we found that mean circulating IGF-I levels were significantly higher in AD patients than in control subjects (Fig A). When considering the rs972936 (C/T) polymorphism, serum IGF-I levels were increased in AD patients carrying the CC genotype compared with AD patients carrying the CT and TT genotypes (Fig B). Surprisingly, we observed that IGF-I levels were statistically increased in AD patients depending on the dose of C allele of the rs972936 (C/T) polymorphism (Fig C). Considering the two subgroups of AD patients classified according to the rs972936 polymorphism, AD patients carrying the CC genotype did not differ regarding age at onset, gender or age.

In our study population, neither the *TTR* rs3764478 nor the rs723744 polymorphisms, which represent 84% of the variability of the gene, were different between AD patients and controls (data not shown). Of the four polymorphisms selected from the *GSN* gene region (representing 37% of the variability of the gene), no differences were observed in the genotype distribution of the rs306760 and rs7870797 polymorphisms between AD patients and control subjects (data not shown). In contrast, we found a weak but significant difference between AD patients and control subjects in the distribution of the *GSN* rs364814 polymorphism ($p = 0.048$; Table 3). We observed the risk of carrying the

RESULTADOS

rs3827677 GG genotype was greater in female AD patients (odds ratio 1.3; 95% CI 1.1-1.7).

Discussion

IGF-I is a physiologically relevant neuroprotective factor with a wide spectrum of actions in the adult brain, including brain A β clearance. IGF-I modulates A β clearance by favouring the passage of A β carrier proteins such as albumin, Ttr or ApoJ,^{11,46} through the choroid plexus and into the brain, and/or inhibiting tau phosphorylation,⁶ or amyloid neurotoxicity,⁵ maintaining cognitive function,⁴⁷ protecting against injury,⁴⁸ enhancing hippocampal neurogenesis and neuronal excitability,⁴⁹⁻⁵¹ synaptic plasticity,⁵² and growth of brain vessels.⁵³ Previous reports have demonstrated that by using different A β -binding agents, such as Gsn or Ttr, increasing A β clearance by circulating IGF-I, or by modulating megalin expression at the choroid plexus epithelium, brain amyloidosis may be reduced.^{54,55,11,17} Despite the physiological role of Gsn and Ttr in A β transport, no evidence of a clear association was observed between *Gsn* or *Ttr* polymorphisms and risk for AD.

One of the major findings in our study was the identification of an *IGF-I* polymorphism that was associated with both an increased risk of AD and high circulating levels of IGF-I. Although to our knowledge, this is one of the first description of a significant association between well-known *IGF-I* polymorphisms and the risk of developing AD, a recent study showed that the *IGF-I* rs35767 polymorphism was associated with AD.²⁸ In our study, we studied this polymorphism but with no significant association to AD. This is not surprising, given the limited number of AD cases available from Giedraitis' study, and the haplotype structure differences between populations.²⁸

Our results showed that homozygosity for the C allele of the rs972936 (C/T) polymorphism was associated with an increased risk for AD. This is an important result because previous findings have shown that the rs972936 (C/T) polymorphism is linked to high circulating levels of IGF-I.²¹

However, although we detected significant differences in serum IGF-I levels between AD patients and controls subjects, our results differ from some obtained by other groups. In the study carried out by Mustafa et al,¹² they found that, compared to age-matched controls, plasma IGF-I levels, as measured by radioimmunoassay, were reduced in family members with AD carrying the Swedish APP 670/671 mutation. A similar study showed that total IGF-I was significantly lower in AD patients than in control subjects.¹⁴ More recently, it was described that serum IGF-I levels were decreased in AD patients.¹⁵ On the contrary, in support of our findings it has been reported that the concentration of serum IGF-I in patients with AD is higher than in normal controls.^{13,56,16} The reasons behind these apparently contradictory findings might include differences in the samples analysed, including size and source (plasma or serum), the methods used (radioimmunoassay versus enzyme-linked immunosorbent assay), and the size and homogeneity of the sample population.

During aging, there is a progressive loss of IGF-I sensitivity.⁵⁷ In addition, both the choroid plexus as well as the brain vasculature manifest structural disturbances that affect their barrier properties and their general functioning.⁵⁸⁻⁶⁰ Therefore, during normal aging, there is a progressive loss of IGF-I signalling together with partial blood-brain barrier dysfunction, a condition compatible with loss of sensitivity to IGF-I.¹³ These two events, coupled together, will likely result in a decrease in brain A β clearance along the aging process.⁶¹ In this sense, we have previously observed that IGF-I receptor impairment leads to brain amyloidosis in rodents.⁹ Very recent studies support this hypothesis. For instance, expression of IGF-I receptors confers cells with abilities to reduce exogenously applied A β oligomers, suggesting that dysfunctions in brain IGF-I receptors contribute to A β aggregation and subsequent synaptic loss.⁶² Additionally, post-mortem investigations have revealed a decreased expression of cerebral IGF-I receptor in brains with different Braak stage severities of AD.⁶³

RESULTADOS

Usually, loss of sensitivity to IGF-I will trigger a compensatory increase in circulating IGF-I levels, as reported in late onset AD patients.^{13,56} This finding is in agreement with our observations that serum IGF-I levels are significantly higher in AD patients than in control subjects. Moreover, the increased trend observed in AD patients of carrying the “at-risk” rs972936 CC genotype might reflect an advanced loss of IGF-I sensitivity.

Our analysis of IGF-I polymorphisms strongly suggests that the presence of the rs972936 (C/T) polymorphism may lead to changes in serum IGF-I levels. Our data indicates that higher circulating IGF-I levels may be a sign of IGF-I resistance that could potentially magnify brain A β accumulation and accelerate the course of AD. In conclusion, variability in the *IGF-I* gene might a new risk factor to consider in the multifactorial genetic pathogenesis of AD.

Disclosure statement

There are no actual or potential conflicts of interest with other people or organizations.

Human studies were approved by the Ethics Committee of the Hospital '12 de Octubre', Hospital Clínico de San Carlos, and Hospital Universitario La Paz in Madrid (Spain), Hospital Santa Creu i Sant Pau in Barcelona (Spain), Hospital Universitario Marqués de Valdecilla in Santander (Spain) and Institute Pere Mata in Reus (Spain), and informed consent was obtained from all patients prior to their participation.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PI060155), Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña (2006.125, 2008.93), CIBERNED, Obra Social Caja Madrid, Comunidad Autónoma de Madrid (GR/SAL/0783/2004). We thank Drs. P. Gil, P. Coria and A. Labad-Alquézar for their cooperation in the generation of the case-control samples. We are grateful to the Asociación para las Familias con Alzheimer (AFALcontigo) de Madrid for their continuous encouragement and help. This work was made possible by the generous participation of the patients, the control subjects, and their families. Finally, we thank Biochemistry Service of Hospital 12 de Octubre for IGF-I determinations, and Ximena Alvira-Botero, MD, PhD for the careful revision of this manuscript.

References

1. Selkoe DJ. Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* 2000;924:17-25.
2. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002 ;297:353-356.
3. Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 2004;43:605-608.
4. Bertram L, McQueen MB, Mullin K, et al. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 2007;39:17-23.
5. Niikura T, Hashimoto Y, Okamoto T, et al. Insulinlike growth factor I (IGF-I) protects cells from apoptosis by Alzheimer's V642I mutant amyloid precursor protein through IGF-I receptor in an IGF-binding protein-sensitive manner. *J Neurosci* 2001;21:1902–1910.
6. Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem* 1997;272:19547–19553.
7. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, et al. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci* 2003;23:7084 – 7092.
8. Schubert M, Gautam D, Surjo D, et al. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:3100 –3105.

9. Carro E, Trejo JL, Spuch C, et al. Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like neuropathology in rodents: new cues into the human disease? *Neurobiol Aging*. 2006;27:1618-1631.
10. Carro E, Trejo JL, Gerber A, et al. Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging* 2006;27:1250-1257.
11. Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, et al. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 2002;8:1390-1397.
12. Mustafa A, Lannfelt L, Lilius L, et al. Decreased plasma insulin-like growth factor-I level in familial Alzheimer's disease patients carrying the Swedish APP 670/671 mutation. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999;10:446-451.
13. Tham A, Nordberg A, Grissom FE, et al. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1993;5:165-176.
14. Murialdo G, Barreca A, Nobili F, et al. Relationships between cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and insulin-like growth factor-I system in dementia. *J Endocrinol Invest* 2001;24:139-146.
15. Alvarez A, Cacabelos R, Sanpedro C, et al. Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 2007;28:533-536.

16. Salehi Z, Mashayekhi F, Naji M. Insulin like growth factor-1 and insulin like growth factor binding proteins in the cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's disease. *Biofactors* 2008;33:99-106.
17. Carro E, Spuch C, Trejo JL, et al. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J. Neurosci* 2005;25:10884-10893.
18. Vargas T, Bullido MJ, Martinez-Garcia A, et al. A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer's disease risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010;5.
19. Fletcher O, Gibson L, Johnson N, et al. Polymorphisms and circulatory levels in the insulin-like growth factor system and risk of breast cancer: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2005;14, 2–19.
20. Wong H.-L, DeLellis K, Probst-Hensch N, et al. A new single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor-1 regulatory region associated with colorectal cancer risk in Singapore Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:144–151.
21. Al-Zahrani A, Sandhu MS, Luben RN, et al. IGF1 and IGFBP3 tagging polymorphisms are associated with circulating levels of IGF1, IGFBP3 and risk of breast cancer. *Hum Mol Genet* 2006;15:1–10.
22. Canzian F, McKay JD, Cleveland RJ, et al. Polymorphisms of genes coding for insulin-like growth factor 1 and its major binding proteins, circulating levels of IGF-1 and IGFBP-3 and breast cancer risk: results from the EPIC study. *Br J Cancer* 2006;94:299–307.

23. Verheus M, McKay JD, Kaaks R, et al. Common genetic variation in the IGF-1 gene, serum IGF-I levels and breast density. *Breast Cancer Res Treat* 2008;112:109-122.
24. Palles C, Johnson N, Coupland B, et al. Identification of genetic variants that influence circulating IGF1 levels: a targeted search strategy. *Hum Mol Genet* 2008;17:1457-1464.
25. Garcia J, Ahmadi A, Wonnacott A, et al. Association of insulin-like growth factor-1 receptor polymorphism in dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006;22:439-444.
26. Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, et al. GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron* 2007;54:713-720.
27. Li H, Wetten S, Li L, et al. Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2008;65:45-53.
28. Giedraitis V, Kilander L, Degerman-Gunnarsson M, et al. Genetic analysis of Alzheimer's disease in the Uppsala Longitudinal Study of Adult Men. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2009;27:59-68.
29. Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc Res Tech* 2001;52:65-82.
30. Vidal R, Garzuly F, Budka H, et al. Meningocerebrovascular amyloidosis associated with a novel transthyretin mis-sense mutation at codon 18 (TTRD 18G). *Am J Pathol* 1996;148:361-366.
31. Hund E, Linke RP, Willig R, Grau A. Transthyretin-associated neuropathic amyloidosis. Pathogenesis and treatment. *Neurology* 2001;56:431-435.

32. Saraiva MJ. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum Mutat* 2001;17:493-503.
33. Matsumoto N, Kitayama H, Kitada M, CET al. Isolation of a set of genes expressed in the choroid plexus of the mouse using suppression subtractive hybridization. *Neuroscience* 2003;117:405-415.
34. Koya RC, Fujita H, Shimizu S, et al. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J Biol Chem* 2000;275:15343-15349.
35. Qiao H, Koya RC, Nakagawa K, et al. Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin. *Neurobiol Aging* 2005;26:849-855.
36. Chauhan V, Ji L, Chauhan A. Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease. *Biogerontology* 2008;9:381-389.
37. Antequera D, Vargas T, Ugalde C, et al. Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2009;36:42-50.
38. Vargas T, Antequera1 D, Ugalde C, et al. Gelsolin restores A β -induced alterations in choroid plexus epithelium. *J Biomed Biotech* 2009.
39. Kiuru S. Gelsolin-related familial amyloidosis Finnish type (FAF), and its variant found worldwide. *Amyloid* 1998;5:55–66.
40. Remes AM, Finnilä S, Mononen H, et al. Hereditary dementia with intracerebral hemorrhages and cerebral amyloid angiopathy. *Neurology*. 2004;63:234-240.

41. McKhann G, Drachman D, Folstein M, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984;34:939-944.
42. Wilson HS, Skodol A. Special report: DSM-IV: overview and examination of major changes. *Arch. Psychiatr Nurs* 1994;8:340-347.
43. Martínez-García A, Sastre I, Tenorio R, Bullido MJ. SNP genotyping with FRET probes. Optimizing the resolution of heterozygotes. *Mol Cell Probes* 2004;18:211-214.
44. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68:978-989.
45. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *Am J Hum Genet* 2005;76:449-462.
46. Carro E, Torres-Aleman I. The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 2004;490:127-133.
47. van Dam PS, Aleman A. Insulin-like growth factor-I, cognition and brain aging. *Eur J Pharmacol* 2004;490:87-95.
48. Carro E, Trejo JL, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J. Neurosci* 2001;21:5678-5684.
49. Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci.* 2000;20:2926-2933.

RESULTADOS

50. Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001;21:1628-1634.
51. Aberg MA, Aberg ND, Hedbäcker H, et al. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000;20:2896-2903.
52. Nuñez A, Carro E, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J Neurophysiol* 2003;89:3008-3017.
53. Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9833-9838.
54. Matsuoka Y, Saito M, LaFrancois J, et al. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *J. Neurosci* 2003;23:29-33.
55. Hirko AC, Meyer EM, King MA, Hughes JA. Peripheral transgene expression of plasma gelsolin reduces amyloid in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Ther* 2007;15: 1623-1629.
56. Vardy ER, Rice PJ, Bowie PC, et al. Increased circulating insulin-like growth factor-1 in late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2007;12:285-290.
57. Willis PE, Chadan S, Baracos V, Parkhouse WS. Acute exercise attenuates age-associated resistance to insulin-like growth factor I. *Am J Physiol* 1997;272:397-404.

58. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003;302:1704-1709.
59. Strazielle N, Gherzi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:561-574.
60. Carter AB, Price DL Jr, Tucci KA, et al. Choroid plexus carcinoma presenting as an intraparenchymal mass. *J Neurosurg* 2001;95:1040-1044.
61. Weller RO, Yow HY, Preston SD, et al. Cerebrovascular disease is a major factor in the failure of elimination of Abeta from the aging human brain: implications for therapy of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002;977:162-168.
62. Zhao WQ, Lacor PN, Chen H, et al. Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric α {beta}. *J Biol Chem* 2009;284:18742-18753.
63. Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis* 2005;8:247-268.

Figure Legend

Figure (A) Serum IGF-I levels are increased in AD patients (n= 88) compared with healthy control subjects (n= 122). **(B)** Serum IGF-I levels in AD patients and control subjects stratified according to the rs972936 (C/T) polymorphism (TT versus TC or CC genotypes in AD patients). **(C)** IGF-I levels were statistically increased in AD patients depending on the dose of the allele C of the rs972936 (C/T) polymorphism. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), *p < 0.05.

Table 1. IGF-I, GSN, and TTR polymorphisms

Gene name	Encoded product	SNP reference ID*	Chromosome	Position in gene #	Chromosome Position	TaqMan®Assay ID	Minor allele frequency (HapMap CEU)
TTR	Transthyretin	rs3764478	18	Promoter (-1357)	29170483	C__27480421_10	0,142
		rs723744	18	Intron 1	29172476	C__1278231_10	0,325
GSN	Gelsolin	rs7870797	9	Promoter (-1657)	124060422	C__1219010_10	0,421
		rs3827677	9	Promoter (-1200)	124060879	C__27522841_10	0,3
		rs306760	9	Intron 5	124076016	C__1219002_10	0,333
		rs364814	9	Intron 16	124094014	C__578202_10	0,2
IGFI	Insulin-like growth factor I	rs35767	12	Promoter (-1245)	102875569	C__799146_10	0,1
		rs5742629	12	Intron 2	102857263	C__29121210_10	0,267
		rs972936	12	Intron 2	102824921	C__2801103_10	0,225
		rs6214	12	3'-UTR	102793569	C__11495137_10	0,421

*Polymorphisms are identified by their dbSNP accession number at

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

#Promoter polymorphisms were numbered from position relative to the transcription start site (corresponding to +1)

Chromosome position corresponds to provisional human genome build 37.1

Table 2. IGF1 genotype distribution in the case-control sample

IGF1	n *	rs35767 (C/T) [†]			χ^{\dagger}	Crude Odds ratio [§]		Adjusted Odds ratio **	
		CC	CT	TT		OR (95% CI) p		OR (95% CI) p	
Cases	1219	0.67	0.28	0.04	0.50	-	-	-	ns
Controls	1086	0.65	0.30	0.05					
		rs5742629 (C/T) [†]							
		CC	CT	TT					
Cases	1221	0.06	0.33	0.61	0.06	1.2 (1.0-1.4)	0.022	1.2 (1.0- 1.4)	0.098
Controls	1076	0.07	0.38	0.56					
		rs972936 (C/T) [†]							
		CC	CT	TT					
Cases	1225	0.63	0.31	0.06	10 ⁻⁴	1.4 (1.2-1.6)	10 ⁻⁴	1.3 (1.1-1.5)	0.007
Controls	1079	0.55	0.39	0.06					
		rs6214 (C/T) [†]							
		CC	CT	TT					
Cases	1215	0.33	0.49	0.18	0.45	-	-	-	ns
Controls	1067	0.35	0.46	0.19					

ns: no significant

*Number of individuals. The differences among groups are due to “missed” genotypes.

†Figures represent the frequencies of each genotype. The SNPs are denoted by their dbSNPs reference codes.

‡Significance for the differences in the genotype distributions (3 x 2 tables; χ^2 Pearson)

§OR (95% CI) and the Fisher’s exact test significance (p) for the following comparisons: IGF1 rs5742629 TT vs any C and rs972936 CC vs any T.

**OR (95% CI) and statistical significance (p) for the same comparisons described above, obtained from a logistic regression model which included, as independent variables, all the genotypes shown in the table plus gender.

Table 3. GSN genotype distribution in the case-control sample

GSN	n [*]	rs7870797 (C/T) [†]			χ^{\ddagger}	Crude Odds ratio [§]		Adjusted Odds ratio ^{**}	
		CC	CT	TT		OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Cases	1188	0.24	0.47	0.29	0.52	-	-	-	-
Controls	1082	0.25	0.49	0.27					
		rs3827677 (A/G) [†]							
		GG	AG	AA					
Cases	1198	0.41	0.47	0.12	0.26	-	-	-	-
Controls	1081	0.44	0.44	0.12					
		rs306760 (C/T) [†]							
		CC	CT	TT					
Cases	1220	0.46	0.43	0.11	0.42	-	-	-	-
Controls	1077	0.48	0.42	0.10					
		rs364814 (C/T) [†]							
		CC	CT	TT					
Cases	1214	0.67	0.30	0.03	0.03	1.7 (1.0-2.7)	0.042	1.7 (1.0-2.8)	0.048
Controls	1070	0.69	0.27	0.04					

ns: no significant

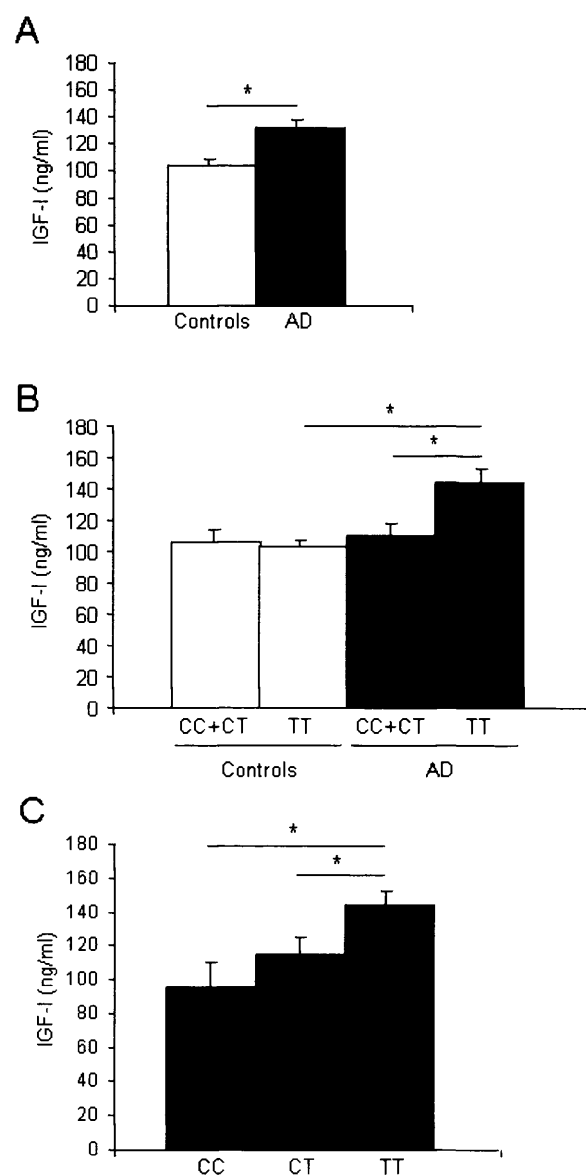
*Number of individuals. The differences among groups are due to “missed” genotypes.

†Figures represent the frequencies of each genotype. The SNPs are denoted by their dbSNPs reference codes.

‡Significance for the differences in the genotype distributions (3 x 2 tables; χ^2 Pearson)

§OR (95% CI) and the Fisher’s exact test significance (p) for the following comparisons: GSN rs364814 TT vs any C.

**OR (95% CI) and statistical significance (p) for the same comparisons described above, obtained from a logistic regression model which included, as independent variables, all the genotypes shown in the table plus gender.



Figure

DISCUSIÓN

1. ALTERACIONES PATOLÓGICAS ASOCIADAS AL PROCESO DE ACLARAMIENTO DEL β -AMILOIDE A NIVEL DE LOS PLEXOS COROIDEOS

1.1. Alteraciones relacionadas con supervivencia celular

[REDACTED]: Vargas T*, Ugalde C*, Spuch C, Antequera D, Morán MJ, Martín MA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E. “*Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis*”. Neurobiol Aging. 2008 Oct 4. [Epub ahead of print]. *These authors have contributed equally to this work

La disfunción mitocondrial es una de las primeras alteraciones que se producen en cerebros de EA (Valla y cols. 2001; Beal 2005; Manczak y cols. 2006), siendo el A β uno de los causantes de dicha disfunción (Canevari y cols. 1999; Casley y cols. 2002). Tras confirmar la presencia de acúmulos de A β en los plexos coroideos (Dietrich y cols. 2008), procedentes de autopsias de enfermos con EA, los cuales están asociados con una disfunción en la transcitosis, demostramos que paralelamente se produce un incremento en la producción de óxido nítrico y muerte celular mediada por disfunción mitocondrial.

Los cambios en la anatomía y fisiología de los plexos coroideos han sido asociados con el envejecimiento y diversas enfermedades del SNC, incluyendo la EA (Serot y cols. 2003), produciéndose a la vez que las alteraciones en la actividad cerebral. Ya se había descrito que la acumulación de inclusiones similares al amiloide o cuerpos de Biondi en las células epiteliales de los plexos coroideos en casos con EA y cerebros de individuos de edad avanzada, podrían afectar la función vital de los plexos coroideos (Wen y cols. 1999).

También se han detectado cambios patológicos en los plexos coroideos en desordenes en el ADN mitocondrial (Cottrell y cols. 2001).

En este estudio nos planteamos estudiar los eventos de señalización involucrados en la disfunción de los plexos coroideos inducido por A β para entender los mecanismos moleculares que llevan a la neurodegeneración en la EA. Nuestra hipótesis de trabajo fue asociar la muerte celular inducida por A β con un incremento en la producción de óxido nítrico y en la disfunción mitocondrial en los

plexos coroideos de pacientes con EA, de forma similar a lo que sucede en neuronas (Keil y cols. 2004).

Las cuantificaciones bioquímicas mostraron un incremento en la producción de óxido nítrico por parte de los plexos coroideos de pacientes con EA asociado con depósitos de A β . Una situación similar se observó en los plexos coroideos de ratones transgénicos APP/PS1 de 12 meses de edad, caracterizados por un incremento notable de la expresión de A β . De acuerdo con estos resultados, también demostramos que el A β_{42} , el cual es mucho más neurotóxico que el A β_{40} (Zhang y cols. 2002; Keil y cols. 2004; Teng y Tang 2005) y altera la integridad de la barrera sangre-LCR (Marco y Skaper 2006), produce un incremento significativo en la producción de óxido nítrico tanto *in vivo* como *in vitro*. Una excesiva producción de óxido nítrico ha sido descrita por diversos autores en la patogénesis de la EA (Smith y cols. 1997; Aliyev y cols. 2004), jugando un importante papel en la disfunción mitocondrial inducida por A β (Keil y cols. 2004).

Observamos una reducción en la actividad citocromo C oxidasa, no solo en el córtex cerebral, de acuerdo con datos previos (Maurer y cols. 2000; Sarti y cols. 2003; Brunori y cols. 2004; Devi y cols. 2006), sino también en los plexos coroideos de pacientes con EA. Los estudios *in vitro* llevados a cabo en las células epiteliales de los plexos coroideos revelaron una reducción en la actividad del complejo IV directamente causados por la exposición al A β_{42} , que también fue capaz de reducir la actividad del complejo I. Estos efectos sobre la actividad mitocondrial también se observaron *in vivo*, tanto en córtex cerebral como en plexos coroideos de pacientes con EA.

Paralelamente a esta reducción en las actividades enzimáticas de los complejos I y IV de la cadena respiratoria, observamos un descenso específico en los niveles de expresión de estos complejos. Una posible explicación a estos resultados podría ser la acumulación de APP que inhibe la entrada de las subunidades del complejo IV codificadas en el núcleo (Devi y cols. 2006). También, la expresión de la proteína del complejo I puede reducirse como resultado de la producción de ROS lo que afectaría la función de la cardiolipina (Petrosillo y cols. 2008). La pérdida de cardiolipina llevaría a un descenso específico del complejo I debido a la inestabilidad de los supercomplejos mitocondriales, como ya se ha demostrado en pacientes con un defecto en la síntesis de cardiolipina (McKenzie y cols. 2006). Con todo ello, estos resultados sugieren que el metabolismo energético mitocondrial puede ser dañado por el A β a través de una regulación a la baja de las proteínas mitocondriales y de su actividad.

Por otra parte, la interacción entre el óxido nítrico y el citocromo C oxidasa controla la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno, el cual se ha visto que está implicado en la señalización redox celular (Galli y cols. 2003; Carreras y cols. 2004). Por ello, decidimos investigar si la generación de ROS también estaba alterada.

Nuestros resultados, mostraron que el A β ₄₂ puede interferir con la fosforilación oxidativa, lo cual provocaría estrés oxidativo, sugiriendo que la generación de ROS es secundario al daño mitocondrial.

Nuestros resultados también mostraron que las células epiteliales de los plexos coroideos tratadas con A β ₄₂ tienen un incremento en la expresión de caspasas 3 y 9. Estos datos concuerdan con un estudio previo en el que células transfectadas con APP mostraban un significativo aumento en la expresión y la actividad de las caspasas 3 y 9 (Marqués y cols. 2003). De esta manera, sugerimos que la generación excesiva de ROS sería responsable de iniciar el proceso de muerte celular apoptótica por una regulación a la alta de la señalización de las caspasas, como ya se había sugerido en neuronas (Takuma y cols. 2005; Zhu y cols. 2006).

A la vista de todos estos resultados, proponemos que la disfunción mitocondrial inducida por A β proporciona una importante fuente de ROS, el cual puede en última instancia iniciar una vía de muerte celular programada en los plexos coroideos de ratones transgénicos APP/PS1 y en pacientes con EA. Esta vía también supondría el incremento en los niveles de MMP-9.

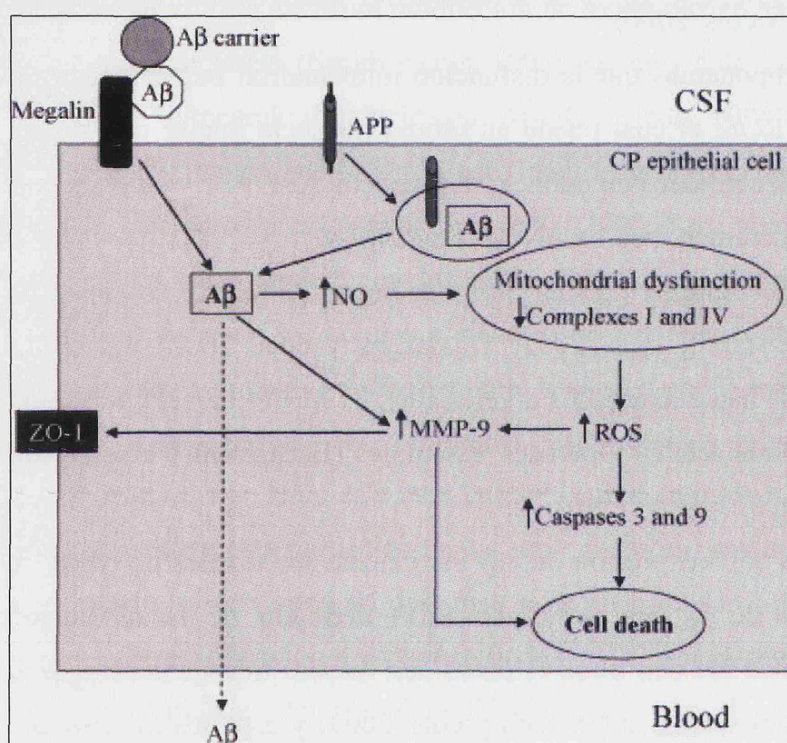
Hemos basado esta última propuesta en estudios previos que mostraron que el A β es capaz de incrementar la producción de MMP-9 (Lee y cols. 2003; Talamagas y cols. 2007). En tejido cerebral de pacientes con EA, también se han encontrados niveles altos de MMP-9 en el citoplasma de neuronas, ovillos neurofibrilares, placas seniles y paredes vasculares (Backstrom y cols. 1996; Asahina y cols. 2001; Lorenzl y cols. 2003).

Nuestros resultados confirmaron que la sobreexpresión de A β incrementa los niveles de MMP-9, tanto directamente como dependiente de la generación de ROS derivado de la disfunción mitocondrial. Estas observaciones concuerdan con otros estudios con ratones transgénicos para la superóxido dismutasa-1 (Morita-Fujimura y cols. 2000; Kim y cols. 2003) y estudios *in vitro* con macrófagos murinos (Woo y cols. 2004), los cuales sugieren que MMP-9 es activado por ROS.

Por otro lado, varios grupos han demostrado el papel de la MMP-9 inducido por A β en la alteración de la BHE (Kim y cols. 2003; Lee y cols. 2003; Talamagas y cols. 2007). Aparentemente la MMP-9 estaría involucrada en la degradación de varias proteínas de unión estrecha, incluyendo ZO-1 (Harkness y cols. 2000; Mori y cols. 2002). Observamos en cultivos de células epiteliales de plexos coroideos tratadas con A β , una pérdida en la expresión de ZO-1. Por consiguiente, y de acuerdo con estudios previos, nuestros resultados sugieren que una elevada expresión de MMP-9, inducida por la acumulación de A β en los plexos coroideos, podría ocasionar un incremento en la permeabilidad de la barrera sangre-LCR mediante un mecanismo similar al producido por la degradación proteolítica de ZO-1 u otras proteínas de unión estrecha (Giebel y cols. 2005; Rosenberg y Yang 2007; Yang y cols. 2007).

Basado en nuestros resultados y en datos previos, proponemos el siguiente modelo para la vía de muerte celular inducida por A β en las células epiteliales de los plexos coroideos: Acumulación de A β \rightarrow incremento en la producción de óxido nítrico (NO) \rightarrow inhibición de los complejos mitocondriales I y IV \rightarrow generación de ROS \rightarrow sobreexpresión de MMP-9 y caspasas, y finalmente \rightarrow muerte celular (Figura 20).

Figura 20: Secuencia hipotética de eventos que llevan a la muerte celular tras la acumulación de A β en las células epiteliales de los plexos coroideos. Bajo condiciones fisiológicas, el A β unido a sus transportadores, es transportado por LRP2/megalina desde el LCR a la sangre. Por otro lado, el A β es producido por endoproteólisis de la proteína precursora del amiloide (APP). Sin embargo, se pueden producir diferentes vías en las células epiteliales de los plexos



coroideos bajo las condiciones de la EA: (1) el A β está involucrado en el incremento en la producción de MMP-9, degradación de la proteína de unión estrecha ZO-1, y finalmente en la disrupción de la barrera y (2) los depósitos de A β en los plexos coroideos produce un aumento en los niveles de óxido nítrico (NO) seguido de la disfunción mitocondrial, lo que puede actuar como un amplificador debido a una actividad reducida de los complejos I y IV, que están involucrados en la generación de ROS, la activación de las caspasas 3 y 9, y en la producción de MMP-9. La convergencia de todas estas vías resulta en la muerte celular.

[REDACTED]: Antequera D*, Vargas T*, Ugalde C, Spuch C, Molina JA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E. "*Cytoplasmic gelsolin increases mitochondrial activity and reduces A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease*". Neurobiol Dis. 2009 Jul 14. [Epub ahead of print]. *These authors have contributed equally to this work

Nuestros resultados indican que la gelsolina citoplasmática está involucrada en la patología de la EA al regular el A β cerebral y sus efectos neurotóxicos, probablemente a través de un proceso de desensamblaje de fibrillas amiloides preformadas, tal y como han sugerido otros autores (Chauhan y cols. 1999; Ray y cols. 2000).

Como punto de partida previo a este estudio, confirmamos la formación de un complejo entre la gelsolina citoplasmática y secretada con el A β de acuerdo con datos publicados hasta la fecha (Chauhan y cols. 1999; Chauhan y cols. 2008; Ji y cols. 2008).

Se ha descrito que la disfunción mitocondrial asociada a la muerte celular, la pérdida de potencial de membrana y la liberación de citocromo C, son procesos abolidos en presencia de la gelsolina citoplasmática (Koya y cols. 2000; Qiao y cols. 2005).

Basado en estos hechos, decidimos investigar si una terapia génica con la forma citoplasmática de la gelsolina en ratones transgénicos APP/PS1 alteraría los efectos del A β y la carga de amiloide. Para confirmar este posible efecto de la gelsolina, también bloqueamos la expresión de gelsolina en los plexos coroideos mediante un ARN de interferencia. La expresión de gelsolina citoplasmática mediada por un vector lentiviral durante 3 meses resultó en una reducción de la carga de amiloide tanto cortical como hipocampal en los ratones APP/PS1. El mecanismo por el cual se produce esta reducción de la carga amiloide cerebral no está todavía esclarecida, se podría pensar en una acción directa de la gelsolina citoplasmática en el parénquima cerebral, contribuyendo a la solubilización de fibrillas de A β preformadas como se ha sugerido en estudios previos (Chauhan y cols. 2008).

Por otra parte, la sobreexpresión de la gelsolina citoplasmática en el parénquima cerebral de ratones APP/PS1 resultó en un descenso en la producción de óxido nítrico, acompañado por una regulación a la alta de la actividad del complejo mitocondrial IV. Varios estudios han demostrado que la gelsolina citoplasmática puede inhibir la apoptosis en linfocitos al bloquear la señal de transducción a nivel mitocondrial (Koya y cols. 2000; Kusano y cols. 2000). Un posible mecanismo que explica esto, puede ser la regulación de los canales iónicos dependientes de voltaje por la gelsolina intracelular asociada a membranas mitocondriales (Furukawa y cols. 1997; Koya y cols. 2000; Kusano y cols. 2000). También se había demostrado que la gelsolina inhibe la apoptosis al bloquear la liberación de citocromo C (Koya y cols. 2000; Qiao y cols. 2005). En nuestro estudio,

proponemos un nuevo mecanismo por el cual la gelsolina sería capaz de modular la función mitocondrial mediante un incremento en la actividad del complejo IV mitocondrial.

Mientras que la muerte celular fue indetectable en el córtex cerebral de ratones APP/PS1, los plexos coroideos exhibieron un fuerte incremento en la muerte celular, el cual fue parcialmente revertido por el tratamiento con gelsolina. Este significativo resultado se podría explicar por un bloqueo de la actividad de la caspasa 3 o a través de los efectos de la gelsolina en la actividad mitocondrial y en la producción de óxido nítrico.

Además, observamos que la inhibición de la expresión génica de gelsolina en ratones APP/PS1 estaba asociada con un incremento en la carga de amiloide cerebral y la respuesta o reacción apoptótica, indicando que el bloqueo del gen *GSN* provocaría una sensibilización del estímulo proapoptótico. Esta observación concuerda con estudios *in vitro* que muestran que las neuronas deficientes en gelsolina tienen un incremento en la muerte celular (Endres y cols. 1999), y que la vulnerabilidad de cultivos de neuronas hipocampales a agentes tóxicos es mayor en células deficientes en gelsolina (Furukawa y cols. 1997; Qiao y cols. 2005).

Nuestros datos amplían los resultados de estudios *in vivo* previos que describen los efectos de la gelsolina citoplasmática en el A β cerebral y en la carga de amiloide. También observamos que la gelsolina intracelular regula la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, afectando de ese modo a la reducción en la producción de óxido nítrico y de la muerte celular. Además, demostramos que la gelsolina citoplasmática protegería contra los efectos tóxicos inducidos por el A β en la barrera formada por los plexos coroideos, donde estaría involucrada en el mantenimiento de la integridad de la barrera sangre-LCR y en el aclaramiento de A β .

Otro resultado significativo que encontramos fue una importante reducción de la gelsolina intracelular en los plexos coroideos, y de la gelsolina secretada en el LCR de pacientes con EA. Por ello, y en base a todos nuestros resultados, el papel fundamental de la gelsolina como agente neuroprotector quedaría reforzado.

1.2. Alteraciones estructurales

[REDACTED]: Vargas T*, Antequera D*, Ugalde C, Spuch C, Carro E. “*Gelsolin restores Abeta-induced alterations in choroid plexus epithelium*”. J Biomed Biotechnol. 2010 Jan 19. *These authors have contributed equally to this work

Como hemos comentado anteriormente, la gelsolina existe tanto como una proteína intracelular (forma citoplasmática) como extracelular (forma secretada en fluidos biológicos) (Kwiatkowski y cols. 1986).

También se ha descrito que la gelsolina secretada se une al A β y es capaz de reducir el A β cerebral (Chauhan y cols. 1999; Matsuoka y cols. 2003; Hirko y cols. 2007).

Nuestros datos apoyan y amplían estas observaciones, indicando la participación de LRP2/megalina, receptor endocítico implicado en el aclaramiento del A β cerebral, en la formación del complejo A β /gelsolina.

Como hemos visto, las alteraciones en el citoesqueleto inducidas por A β ₄₂ están asociadas con la degradación proteolítica de la proteína asociada a las uniones estrechas, ZO-1 (Marco y Skaper 2006; Vargas y cols. 2008). Tras el tratamiento con gelsolina secretada, hemos observado una relocalización de la proteína ZO-1 desde el citoplasma a su posición original en la membrana celular de las células epiteliales de los plexos coroideos. Además, sugerimos que la forma secretada de la gelsolina previene la internalización de ZO-1 al bloquear la fosforilación de serina, de acuerdo con estudios previos (Ohtake y cols. 2003; Collins y cols. 2006; Rincon-Choles y cols. 2006).

En este estudio, también demostramos que el A β ₄₂ fibrilar provoca alteraciones en la actina del citoesqueleto en células epiteliales de los plexos coroideos, y que la gelsolina es capaz de proteger frente a estos efectos, contribuyendo al mantenimiento de la monocapa de los plexos coroideos, y a la integridad de la barrera sangre-LCR. Una posible explicación para todos estos efectos podría ser que el A β incrementa la expresión de MMP-9 (Lee y cols. 2003; Talamagas y cols. 2007; Vargas y cols. 2008), la cual es capaz de cortar la gelsolina citoplasmática (Candiano y cols. 2005), resultando en la desestabilización de los filamentos de actina y la interrupción de las uniones estrechas. La gelsolina secretada, uniéndose y secuestrando A β , podría ser capaz de prevenir y disminuir estos efectos tóxicos del A β , protegiendo así al citoesqueleto y la estructura de la barrera formada por los plexos coroideos.

Previamente hemos descrito que la disfunción mitocondrial inducida por A β podría iniciar en última instancia una vía de muerte celular programada en las células epiteliales de los plexos

coroideos (Vargas y cols. 2008). En este estudio, demostramos que la gelsolina secretada podría prevenir la muerte celular inducida por A β al incrementar la actividad enzimática del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial en las células epiteliales de los plexos coroideos.

Puesto que la gelsolina secretada se ha detectado en el LCR, donde su concentración está significativamente alterada en ciertas condiciones neurológicas (Kulakowska y cols. 2008) incluyendo la EA, donde sus niveles se ven reducidos (Vargas y cols. 2008), esta isoforma extracelular de la gelsolina puede reducir la patología del A β en los plexos coroideos de forma similar a lo descrito con la gelsolina citoplasmática (Matsuoka y cols. 2003; Hirko y cols. 2007).

Y en vista de estos resultados, sugerimos que la gelsolina secretada jugaría un papel fundamental modulando las alteraciones inducidas por A β en la barrera sangre-LCR.

2. GENES CANDIDATOS IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE β -AMILOIDE COMO POSIBLES FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

A pesar de que los dos tipos de la EA - familiar y esporádica - comparten unas características clínicas semejantes, su etiología es completamente diferente. Así, si la EA familiar es fundamentalmente genética, con origen en mutaciones en uno de los tres genes identificados hasta la fecha (*APP*, *PSEN1* y *PSEN2*), la EA esporádica es mucho más compleja y en ella convergen factores tanto genéticos como ambientales.

Hay multitud de factores genéticos descritos como de susceptibilidad para la EA esporádica, que actúan en distintas vías de señalización o en distintos módulos funcionales (Bertram y cols. 2007).

En nuestro grupo de investigación, nos planteamos el estudio de polimorfismos como posibles indicadores de la implicación de funciones candidatas en la patogénesis de la EA esporádicas, seleccionando dichos polimorfismos en genes que surgen como candidatos a partir de datos bibliográficos y, mayoritariamente, de modelos celulares y animales de neurodegeneración puestos a punto previamente en nuestro laboratorio. Prácticamente ninguno de estos genes había sido estudiado previamente por su relación con la EA.

2.1. Polimorfismos en el gen *LRP2/Megalina*

[REDACTED]: Vargas T*, Bullido MJ*, Martínez-García A, Antequera D, Clarimón J, Rosich-Estrago M, Martín-Requero A, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Combarros O, Gómez-Isla T, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Carro E. "*A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer's disease risk*". Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5. [Epub ahead of print]. *These authors have contributed equally to this work

Hasta la fecha, muchos investigadores de la comunidad científica apoyan la hipótesis de que la acumulación de $A\beta$ en el parénquima cerebral constituye la mayor amenaza para la función neuronal. En este sentido, el número de estudios genéticos, bioquímicos y en modelos animales apoyando este mecanismo es cada vez mayor (Selkoe 2001c).

Aunque en este sentido la mayor parte de los estudios se han centrado en los complejos mecanismos de la producción de $A\beta$, incluyendo el papel de las β - y γ -secretasas, en la generación

del A β a partir de su proteína precursora, el APP, un incremento en la producción de A β solo explicaría una minoría de los casos, especialmente aquellos que cursan con mutaciones heredadas en el gen *APP* ó *PSEN1* o *PSEN2*. Este hecho abre la posibilidad que algunos, quizás muchos casos de EA están causados por un deficiente aclaramiento de A β , un péptido que es producido en niveles normales a lo largo de la vida (Selkoe 2001c). Sorprendentemente, los mecanismos de aclaramiento de A β han recibido menos atención, aunque afortunadamente esto está empezando a cambiar.

El LRP2/megalina, una proteína multifuncional involucrada en la señalización celular y en la endocitosis mediada por receptor (Gotthardt y cols. 2000; Christensen y Birn 2002), puede participar en condiciones neurológicas tales como la EA, en virtud de su habilidad para endocitar apolipoproteínas, incluyendo ApoJ, ApoE y otras proteínas transportadoras de A β (Moestrup y Verroust 2001; Christensen y Birn 2002). Esto último ha sido reforzado por descubrimientos muy recientes que identifican una asociación entre variantes de ApoJ (también llamado clusterina) con la EA (Harold y cols. 2009; Lambert y cols. 2009).

Diversos estudios confirman el papel crucial de LRP2/megalina en la neuroprotección, incluyendo su implicación en el aclaramiento cerebral de A β (Hammad y cols. 1997; Deane y cols. 2004; Zerbinatti y cols. 2004) y el transporte de factores de crecimiento neurotróficos tales como la insulina (Orlando y cols. 1998) o IGF-I (Carro y cols. 2005a). En base a ello, sugerimos que la disfunción de LRP2/megalina podría estar involucrada en la patogénesis de la EA esporádica. Esta última idea es reforzada por el hecho de que la expresión de LRP2/megalina se reduce con la edad (Carro y cols. 2005a; Dietrich y cols. 2008), la cual, a su vez, es el mayor factor de riesgo en la EA.

Con esta idea, nos propusimos determinar si la variabilidad genética de LRP2/megalina podría representar un factor de riesgo para la EA. Hasta la fecha, este estudio es el primero en describir una asociación significativa entre polimorfismos en el gen *LRP2/megalina* y el riesgo a desarrollar EA.

Nuestros resultados revelaron que los portadores homocigotos del alelo A para el polimorfismo rs3755166 (G/A) están asociados con un incremento del riesgo a desarrollar la EA. Estos resultados son significativos por varias razones. La primera, porque una asociación entre los polimorfismos en el gen *LRP2/megalina* y la EA sugieren un nuevo vínculo genético entre la EA, los niveles de A β cerebral, y el LRP2/megalina. La segunda, porque estos resultados ayudan a identificar un nuevo factor de riesgo genético para la EA el cual podría contribuir al diagnóstico

de pacientes con EA. Además, estos datos pueden llevar al descubrimiento de un nuevo mecanismo subyacente a la EA, y de ese modo sugiere un nuevo enfoque terapéutico.

En los últimos años, considerables evidencias han confirmado que variaciones en el promotor de ciertos genes pueden llevar a la patogénesis de varias enfermedades neurológicas, incluyendo la enfermedad de Parkinson (Wang y cols. 2006), la enfermedad de Huntington (Coles y cols. 1998) y la EA (Fallin y cols. 2001; Heijmans y cols. 2002). En un estudio reciente se aportaron evidencias de que polimorfismos en el promotor del gen *APP*, el cual tiene una alta actividad transcripcional, producen una sobre-expresión de esta proteína (Lv y cols. 2008).

Para aclarar más la asociación entre el polimorfismo del promotor del *LRP2/megalina* con la EA, realizamos un ensayo funcional en líneas celulares neuronales y no neuronales. En nuestro estudio, la actividad transcripcional del promotor del *LRP2/megalina* portador del alelo A para el polimorfismo rs3755166 (G/A) se reducía en un 20% comparado con la actividad del mismo promotor portador del alelo G. Esto sugiere que el promotor del *LRP2/megalina* portador de la variante A del polimorfismo rs3755166, puede tener una menor actividad transcripcional, lo que podría traducirse en una menor expresión de la proteína.

Por otra parte, observamos que la variante de riesgo del promotor del gen *LRP2/megalina* era más frecuente en sujetos con EA no portadores de ApoE ϵ 4. Este hecho se podría explicar como un posible mecanismo compensatorio. El ApoE ϵ 4, el cual está asociado con un incremento en el riesgo de EA, es proporcional a la reducción de los niveles de ApoE en el hipocampo y en córtex frontal observado en sujetos con EA (Bertrand y cols. 1995).

En apoyo de esta hipótesis, estudios previos han descrito que ApoE está regulada a la alta después de un daño cerebral agudo (Page y cols. 1998; Aoki y cols. 2003), acompañado de una regulación a la baja de LRP (Marzolo y cols. 2000) y a la expresión de *LRP2/megalina* (dato sin publicar).

En resumen, nuestros análisis del polimorfismo del promotor del gen *LRP2/megalina* sugieren que la presencia del polimorfismo rs3755166 (G/A) puede llevar a importantes cambios en la expresión de *LRP2/megalina*, y de esta forma, contribuir al desarrollo de la EA. Estos efectos podrían contribuir a la acumulación cerebral de A β , acelerando el curso de la EA. En conclusión, el gen *LRP2/megalina* puede ser considerado como un nuevo factor de riesgo en nuestra población en estudio.

2.2. Polimorfismos en los genes *GSN* y *TTR*

2.3. Polimorfismos en el gen *IGF-I*

■: Vargas T*, Martínez-García A*, Antequera D, Vilella-Cuadrada E, Clarimón J, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Frank A, Rosich-Estrago M, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Gómez-Isla T, Combarros O, Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Bullido MJ, Carro E. “*IGF-I gene variability is associated with an increased risk for AD*”. *Annals of Neurology*. *These authors have contributed equally to this work

Se ha sugerido que el principal factor que lleva a un incremento en los niveles cerebrales de A β soluble en pacientes con EA, es su acumulación en los tejidos más que a una mayor producción, la cual se mantendría en niveles normales a lo largo de la vida (Selkoe 2001d).

De este modo, la regulación en el aclaramiento de A β , por mecanismos de transporte a nivel de la BHE, puede ser un factor etiopatológico en esta enfermedad neurodegenerativa. En diversos estudios previos, hemos observado que el aclaramiento de A β y por extensión la amiloidosis cerebral, se puede ver favorecido por diversos mecanismos: la modulación del IGF-I, y proteínas de unión al A β , tales como gelsolina y transtirretina, o la modulación de la expresión de LRP2/megalina en el epitelio de los plexos coroideos (Carro y cols. 2002; Matsuoka y cols. 2003; Carro y cols. 2005a; Hirko y cols. 2007). Como hemos visto anteriormente, un polimorfismo en el promotor del gen *LRP2/megalina* confiere un mayor riesgo para la EA (Vargas y cols. 2009).

Apoyando esta hipótesis, decidimos investigar si la variabilidad genética en el IGF-I y en las proteínas de unión a A β , gelsolina y transtirretina, podrían representar un riesgo adicional para la EA.

En este estudio identificamos genotipos específicos que confieren un riesgo incrementado para el desarrollo de la EA esporádica en pacientes españoles. Aunque la transtirretina juega un papel importante en la amiloidosis cerebral, no se encontraron diferencias en las frecuencias genotípicas entre pacientes con EA y controles en los polimorfismos estudiados para el gen *TTR*.

Encontramos un pequeño, aunque significativo incremento en el riesgo a desarrollar EA asociado con los polimorfismos rs364814 y rs3827677 en el gen *GSN*, sugiriendo su asociación con la EA. Finalmente, identificamos un polimorfismo en el gen *IGF-I* que se asocia con un importante incremento en el riesgo a desarrollar EA y con altos niveles de IGF-I circulante. Los homocigotos para el alelo C del polimorfismo rs972936 (C/T) están asociados con un alto riesgo para la EA. Este dato es significativo porque el polimorfismo rs972936 (C/T) muestra una asociación con los niveles circulantes de IGF-I, de acuerdo con estudios previos (Al-Zahrani y cols. 2005). En este

estudio, encontramos diferencias significativas en los niveles séricos de IGF-I entre pacientes con EA y controles, aunque hay discrepancias entre nuestros descubrimientos y otros resultados.

El estudio de Mustafa reveló una reducción en los niveles de IGF-I en plasma, medidos por radioinmunoensayo (RIA), en miembros de familias portadoras de la mutación sueca APP 670/671 con EA, comparado con controles de la misma edad (Mustafa y cols. 1999). Otros estudios mostraron que el IGF-I total descendía significativamente en pacientes con EA comparado con controles (Murialdo y cols. 2001). Más recientemente, se ha descrito que los niveles de IGF-I séricos descienden en pacientes con EA (Álvarez y cols. 2007). Por otro lado, apoyando nuestros resultados, se ha visto que la concentración de IGF-I sérico en los pacientes con EA estaban incrementados comparados con controles (Tham y cols. 1993; Vardy y cols. 2007; Salehi y cols. 2008). Todos estos resultados opuestos se pueden deber a las distintas muestras analizadas, incluyendo el tamaño muestral y el tipo de muestra (plasma o suero), el método usado (radioinmunoensayo o ELISA), o incluso la población en estudio.

Durante el envejecimiento, se produce una pérdida progresiva de sensibilidad a IGF-I (Willis y cols. 1997).

Adicionalmente, tanto los plexos coroideos como la vasculatura cerebral, manifiestan alteraciones estructurales que afectan a sus propiedades como barrera y a su funcionamiento general (Strazielle y Gershi-Egea 2000; Carter y cols. 2002; Ridley y cols. 2003). Por lo tanto, durante el envejecimiento normal o no patológico, hay una pérdida progresiva de la señalización de IGF-I junto con una disfunción parcial de la BHE, una condición compatible con la pérdida de sensibilidad a IGF-I (Tham y cols. 1993). Estos dos eventos, de forma conjunta, producen un descenso en el aclaramiento de A β cerebral a lo largo del proceso de envejecimiento (Weller y cols. 2002). En este sentido, se ha observado en ratones que una alteración del receptor IGF-I lleva a amiloidosis cerebral (Weller y cols. 2002; Carro y cols. 2006b). Estudios muy recientes apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, la expresión del receptor IGF-I confiere a las células capacidad de reducir oligómeros de A β administrados exógenamente, sugiriendo que la disfunción del receptor IGF-I en cerebro contribuye a la agregación de A β y la consiguiente pérdida sináptica (Zhao y cols. 2009).

Por otra parte, estudios postmortem revelaron un descenso en la expresión del receptor IGF-I cerebral en cerebros con diferentes estadios de severidad según Braak (Rivera y cols. 2005).

Normalmente, la pérdida de sensibilidad a IGF-I provoca un incremento compensatorio en los niveles de IGF-I circulante, como se ha descrito en pacientes con EA senil (Tham y cols. 1993; Carro y Torres-Alemán 2004).

Todos estos estudios podrían explicar el incremento en los niveles séricos de IGF-I observados en pacientes con EA.

Además, el aumento observado en pacientes con EA portadores del genotipo de riesgo rs972936 CC puede reflejar una pérdida temprana de sensibilidad a IGF-I.

En conclusión, la asociación entre la variabilidad en el gen *IGF-I* y la EA añade un nuevo factor de riesgo a la contribución genética multifactorial de la patogénesis de la EA. Además, nuestros análisis de polimorfismos en el gen *IGF-I* sugieren que la presencia de la variante rs972936 (C/T) puede ir asociada a cambios en los niveles de IGF-I séricos, que pueden ser una señal de resistencia a IGF-I, lo cual podría contribuir a la acumulación de A β cerebral y a la progresión de la EA.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Se han descrito nuevos mecanismos patológicos asociados al proceso de aclaramiento del A β a través de los plexos coroideos que implican alteraciones funcionales y estructurales.

1.1. La acumulación de A β en los plexos coroideos, procedentes de autopsias de enfermos de Alzheimer y de ratones APP/PS1, desencadena una cascada pro-apoptótica, que se iniciaría con un incremento en la producción de óxido nítrico, seguida de una inhibición en la actividad de los complejos mitocondriales I y IV, generación de ROS y sobre-expresión de MMP-9 y caspasas. La integridad de la barrera sangre-LCR también se ve comprometida por la acumulación de A β en los plexos coroideos al reducir la expresión de la proteína ZO-1.

1.2. Una terapia génica con gelsolina citoplasmática es capaz de revertir los efectos pro-apoptóticos del A β en los plexos coroideos de ratones APP/PS1, atenuando la producción de óxido nítrico e incrementando la actividad del complejo mitocondrial IV. La gelsolina citoplasmática también es capaz de reducir la carga cerebral de A β en ratones APP/PS1.

1.3. En enfermos de Alzheimer, tanto la forma citoplasmática de la gelsolina, en plexos coroideos, como la secretada, en el LCR, se encuentran significativamente reducidas.

1.4. La gelsolina secretada es capaz de revertir la degradación y translocación de la proteína ZO-1 inducida por A β en los plexos coroideos, restaurando las uniones estrechas y la estructura en monocapa de dicho epitelio.

1.5. La gelsolina, tanto en su forma citoplasmática como secretada, se une a LRP2/megalina a nivel de los plexos coroideos, lo que sumado a su capacidad de unión al A β sugiere una nueva función potencial en el mecanismo de aclaramiento del A β cerebral hacia la sangre.

2. Estudios de asociación genética en una extensa muestra poblacional española han permitido determinar que genes implicados en el proceso de aclaramiento del A β cerebral, incluyendo LRP2/megalina, IGF-I, y proteínas de unión al A β (gelsolina y transtirretina) pueden ser considerados nuevos factores de riesgo de EA.

2.1. Hemos encontrado que un polimorfismo situado en el promotor del gen *LRP2/megalina*, cuya variante alélica está asociado a una menor actividad transcripcional, confiere una mayor susceptibilidad para el desarrollo de EA, probablemente por la reducción de sus efectos fisiológicos, lo que confirma el papel biológico de LRP2/megalina en el proceso neurodegenerativo de la EA. Este hecho es de especial importancia porque podría indicar una disminución en la expresión de dicho receptor.

2.2. El estudio de varios polimorfismos en el gen *IGF-I* ha permitido definir un polimorfismo que está asociado con cambios en los niveles circulantes de dicho factor trófico. Cuando consideramos esta variante alélica, los niveles séricos de IGF-I se ven incrementados en el grupo de enfermos de Alzheimer. Previamente, habíamos observado que los niveles de IGF-I circulante en dichos enfermos son más altos que los de los sujetos controles o no-dementes.

2.3. También se ha estudiado la posible asociación genética de los genes *GSN* y *TTR* con la EA en la muestra poblacional, no encontrándose asociación en el caso del gen *TTR* y sí en dos polimorfismos del gen *GSN*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham y cols. 2006:** Abraham J, Earl HM, Pharoah PD, Caldas C. Pharmacogenetics of cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec;1766(2):168-83. Epub 2006 Oct 25. Review.
- Aguado y cols. 1993:** Aguado F, Rodrigo J, Cacicedo L, Mellström B. Distribution of insulin-like growth factor-I receptor mRNA in rat brain. Regulation in the hypothalamo-neurohypophysial system. *J Mol Endocrinol*. 1993 Oct;11(2):231-9.
- Ahuja y cols. 2008:** Ahuja R, Yammani R, Bauer JA, Kalra S, Seetharam S, Seetharam B. Interactions of cubilin with megalin and the product of the amnionless gene (AMN): effect on its stability. *Biochem J*. 2008 Mar 1;410(2):301-8.
- Akama y cols. 1998:** Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ. Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5795-800.
- Akiyama y cols. 2000:** Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000 May-Jun;21(3):383-421. Review.
- Aldred y cols. 1995:** Aldred AR, Brack CM, Schreiber G. The cerebral expression of plasma protein genes in different species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 1995 May;111(1):1-15.
- Aliyev y cols. 2004:** Aliyev A, Seyidova D, Rzayev N, Obrenovich ME, Lamb BT, Chen SG, Smith MA, Perry G, de la Torre JC, Aliev G. Is nitric oxide a key target in the pathogenesis of brain lesions during the development of Alzheimer's disease? *Neurol Res*. 2004 Jul;26(5):547-53. Review.
- Álvarez y cols. 2007:** Alvarez A, Cacabelos R, Sanpedro C, García-Fantini M, Aleixandre M. Serum TNF-alpha levels are increased and correlate negatively with free IGF-I in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2007 Apr;28(4):533-6. Epub 2006 Mar 29.
- Álvarez y cols. 2001:** Alvarez A, Muñoz JP, Maccioni RB. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res*. 2001 Apr 1;264(2):266-74.
- Alves y cols. 1997:** Alves IL, Altland K, Almeida MR, Winter P, Saraiva MJ. Screening and biochemical characterization of transthyretin variants in the Portuguese population. *Hum Mutat*. 1997;9(3):226-33.
- Al-Zahrani y cols. 2005:** Al-Zahrani A, Sandhu MS, Luben RN, Thompson D, Baynes C, Pooley KA, Luccarini C, Munday H, Perkins B, Smith P, Pharoah PD, Wareham NJ, Easton DF, Ponder BA, Dunning AM. IGF1 and IGFBP3 tagging polymorphisms are associated with circulating levels of IGF1, IGFBP3 and risk of breast cancer. *Hum Mol Genet*. 2006 Jan 1;15(1):1-10. Epub 2005 Nov 23.
- Amaducci y Tesco 1994:** Amaducci L, Tesco G. Aging as a major risk for degenerative diseases of the central nervous system. *Curr Opin Neurol*. 1994 Aug;7(4):283-6.
- Ambjørn y cols. 2008:** Ambjørn M, Asmussen JW, Lindstam M, Gotfryd K, Jacobsen C, Kiselyov VV, Moestrup SK, Penkowa M, Bock E, Berezin V. Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *J Neurochem*. 2008 Jan;104(1):21-37. Epub 2007 Nov 6.
- Andersen 2004:** Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. 2004 Jul;10 Suppl:S18-25. Review.
- Ando y cols. 1995:** Ando Y, Tanaka Y, Nakazato M, Ericzon BG, Yamashita T, Tashima K, Sakashita N, Suga M, Uchino M, Ando M. Change in variant transthyretin levels in patients with familial amyloidotic polyneuropathy type I following liver transplantation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Jun 15;211(2):354-8.
- Andreassen 2006:** Andreassen TK. The role of plasma-binding proteins in the cellular uptake of lipophilic vitamins and steroids. *Horm Metab Res*. 2006 Apr;38(4):279-90.

- Anson y Paran 2005:** Anson O, Paran E. Hypertension and cognitive functioning among the elderly: an overview. *Am J Ther.* 2005 Jul-Aug;12(4):359-65.
- Aoki y cols. 2003:** Aoki K, Uchihara T, Sanjo N, Nakamura A, Ikeda K, Tsuchiya K, Wakayama Y. Increased expression of neuronal apolipoprotein E in human brain with cerebral infarction. *Stroke.* 2003 Apr;34(4):875-80. Epub 2003 Mar 20.
- Araujo y cols. 1989:** Araujo DM, Lapchak PA, Collier B, Chabot JG, Quirion R. Insulin-like growth factor-I (somatomedin-C) receptors in the rat brain: distribution and interaction with the hippocampal cholinergic system. *Brain Res.* 1989 Apr 10;484(1-2):130-8.
- Argraves y Morales 2004:** Argraves WS, Morales CR. Immunolocalization of cubilin, megalin, apolipoprotein J, and apolipoprotein A-I in the uterus and oviduct. *Mol Reprod Dev.* 2004 Dec;69(4):419-27.
- Arnold y cols. 1991:** Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex.* 1991 Jan-Feb;1(1):103-16.
- Arriagada y cols. 1992:** Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT. Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1992 Sep;42(9):1681-8.
- Artiga y cols. 1998a:** Artiga MJ, Bullido MJ, Frank A, Sastre I, Recuero M, García MA, Lendon CL, Han SW, Morris JC, Vázquez J, Goate A, Valdivieso F. Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the APOE gene. *Hum Mol Genet.* 1998 Nov;7(12):1887-92.
- Artiga y cols. 1998b:** Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, García MA, Aldudo J, Vázquez J, Valdivieso F. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett.* 1998 Jan 9;421(2):105-8.
- Asahina y cols. 2001:** Asahina M, Yoshiyama Y, Hattori T. Expression of matrix metalloproteinase-9 and urinary-type plasminogen activator in Alzheimer's disease brain. *Clin Neuropathol.* 2001 Mar-Apr;20(2):60-3.
- Ávila 2004:** Avila J. The influence of aging in one tauopathy: Alzheimer's disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2004 Nov-Dec;52(6):410-3.
- Bach y cols. 1991:** Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe WL Jr, Roberts CT Jr, LeRoith D. Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1991 Apr;10(1):43-8.
- Backstrom y cols. 1996:** Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tökés ZA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci.* 1996 Dec 15;16(24):7910-9.
- Barnham y cols. 2004:** Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Mar;3(3):205-14. Review.
- Baud y cols. 2004:** Baud O, Li J, Zhang Y, Neve RL, Volpe JJ, Rosenberg PA. Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci.* 2004 Oct;20(7):1713-26.
- Baxter y cols. 1989:** Baxter RC, Martin JL, Beniac VA. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. *J Biol Chem.* 1989 Jul 15;264(20):11843-8.
- Beal 2005:** Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol.* 2005 Oct;58(4):495-505. Review.
- Behl y cols. 1994:** Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell.* 1994 Jun 17;77(6):817-27.
- Bell y Zlokovic 2009:** Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009 Jul;118(1):103-13. Epub 2009 Mar 25.
- Bento-Abreu y cols. 2008:** Bento-Abreu A, Velasco A, Polo-Hernández E, Pérez-Reyes PL, Tabernero A, Medina JM. Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem.* 2008 Aug;106(3):1149-59. Epub 2008 May 5.

- Bermejo-Pareja y cols. 2008:** Bermejo-Pareja F, Benito-León J, Vega S, Medrano MJ, Román GC Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group. *J Neurol Sci.* 2008 Jan 15;264(1-2):63-72.
- Bertoni-Freddari y cols. 1996:** Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, Caselli U, Meier-Ruge W. Deterioration threshold of synaptic morphology in aging and senile dementia of Alzheimer's type. *Anal Quant Cytol Histol.* 1996 Jun;18(3):209-13.
- Bertram y cols. 2007:** Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):17-23.
- Bertram y Tanzi 2004:** Bertram L, Tanzi RE. The current status of Alzheimer's disease genetics: what do we tell the patients? *Pharmacol Res.* 2004 Oct;50(4):385-96. Review.
- Bertram y Tanzi 2005:** Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 2005 Jun;115(6):1449-57. Review.
- Bertrand y cols. 1995:** Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM. Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995 Oct;33(1):174-8.
- Birn 2006:** Birn H. The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006 Jul;291(1):F22-36. Review.
- Blacker y cols. 1998:** Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, et al. β 2-macroglobulin is a genetically associated with Alzheimers disease. *Nat Genet* 1998;19:357-360.
- Blackhall y cols. 2006:** Blackhall FH, Howell S, Newman B. Pharmacogenetics in the management of breast cancer -- prospects for individualised treatment. *Fam Cancer.* 2006;5(2):151-7. Review.
- Blair y Marshall 1997:** Blair LA, Marshall J. IGF-1 modulates N and L calcium channels in a PI 3-kinase-dependent manner. *Neuron.* 1997 Aug;19(2):421-9.
- Blalock y cols. 2005:** Blalock EM, Chen KC, Stromberg AJ, Norris CM, Kadish I, Kraner SD, Porter NM, Landfield PW. Harnessing the power of gene microarrays for the study of brain aging and Alzheimer's disease: statistical reliability and functional correlation. *Ageing Res Rev.* 2005 Nov;4(4):481-512. Epub 2005 Oct 27.
- Blennow y cols. 2006:** Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006 Jul 29;368(9533):387-403.
- Bornemann y cols. 2001:** Bornemann KD, Wiederhold KH, Pauli C, Ermini F, Stalder M, Schnell L, Sommer B, Jucker M, Staufenbiel M. Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol.* 2001 Jan;158(1):63-73.
- Borlongan y cols. 2008:** Borlongan CV, Thanos CG, Skinner SJ, Geaney M, Emerich DF. Transplants of encapsulated rat choroid plexus cells exert neuroprotection in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant.* 2008;16(10):987-92.
- Braak y Braak 1996:** Braak H, Braak E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1996;165:3-12. Review.
- Brissenden y cols. 1984:** Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* 1984;310:781-4.
- Brookes 2001:** Brookes AJ. Rethinking genetic strategies to study complex diseases. *Trends Mol Med.* 2001 Nov;7(11):512-6. Review.
- Brown y Borutaite 2002:** Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med.* 2002 Dec 1;33(11):1440-50.
- Brunkan y Goate 2005:** Brunkan AL, Goate AM. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J Neurochem.* 2005 May;93(4):769-92. Review.

- Brunori y cols. 2004:** Brunori M, Giuffrè A, Forte E, Mastronicola D, Barone MC, Sarti P. Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Apr 12;1655(1-3):365-71. Review.
- Brywe y cols. 2005:** Brywe KG, Mallard C, Gustavsson M, Hedtjörn M, Leverin AL, Wang X, Blomgren K, Isgaard J, Hagberg H. IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? *Eur J Neurosci*. 2005 Mar;21(6):1489-502.
- Buée y cols. 2000:** Buée L, Bussiére T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Aug;33(1):95-130. Review.
- Bullido y cols. 1998:** Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, García MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vázquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet*. 1998 Jan;18(1):69-71.
- Bullido y cols. 2004:** Bullido MJ, Ramos MC, Ruiz-Gómez A, Tutor AS, Sastre I, Frank A, Coria F, Gil P, Mayor F Jr, Valdivieso F. Polymorphism in genes involved in adrenergic signaling associated with Alzheimer's. *Neurobiol Aging*. 2004 Aug;25(7):853-9.
- Butterfield y cols. 1994:** Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson M, Carney J. beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Apr 29;200(2):710-5.
- Butterfield y Stadtman 1997:** Butterfield, DA, Stadtman ER. Protein oxidation processes in aging brain. *Cell Aging Gerontol*. 1997; 2: 161-191.
- Buxbaum y cols. 2008:** Buxbaum JN, Ye Z, Reixach N, Friske L, Levy C, Das P, Golde T, Masliah E, Roberts AR, Bartfai T. Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of AB toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 19;105(7):2681-6. Epub 2008 Feb 12.
- Cam y Bu 2006:** Cam JA, Bu G. Modulation of beta-amyloid precursor protein trafficking and processing by the low density lipoprotein receptor family. *Mol Neurodegener*. 2006 Aug 18;1:8.
- Camins y cols. 2006:** Camins A, Verdager E, Folch J, Canudas AM, Pallàs M. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect*. 2006 Oct;19(8):453-60.
- Candiano y cols. 2005:** Candiano G, Bruschi M, Pedemonte N, Caci E, Liberatori S, Bini L, Pellegrini C, Viganò M, O'Connor BJ, Lee TH, Galletta LJ, Zegarra-Moran O. Gelsolin secretion in interleukin-4-treated bronchial epithelia and in asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Nov 1;172(9):1090-6. Epub 2005 Aug 11.
- Canevari y cols. 1999:** Canevari L, Clark JB, Bates TE. beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett*. 1999 Aug 20;457(1):131-4.
- Carreras y cols. 2004:** Carreras MC, Converso DP, Lorenti AS, Barbich M, Levisman DM, Jaitovich A, Antico Arciuch VG, Galli S, Poderoso JJ. Mitochondrial nitric oxide synthase drives redox signals for proliferation and quiescence in rat liver development. *Hepatology*. 2004 Jul;40(1):157-66.
- Carro y cols. 2005a:** Carro E, Spuch C, Trejo JL, Antequera D, Torres-Aleman I. Choroid plexus megalin is involved in neuroprotection by serum insulin-like growth factor I. *J Neurosci*. 2005 Nov 23;25(47):10884-93.
- Carro y Torres-Alemán 2004:** Carro E, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I and Alzheimer's disease: therapeutic prospects? *Expert Rev Neurother*. 2004 Jan;4(1):79-86.
- Carro y cols. 2006a:** Carro E, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I in brain function. *Keio J Med*. 2006 Jun;55(2):59-63. Review.
- Carro y cols. 2001:** Carro, E., Trejo, J.L., Busiguina, S., and Torres-Aleman, I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci*. 2001 Aug 1;21(15):5678-84.
- Carro y cols. 2005b:** Carro E, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, Torres- Alemán I. Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging*. 2005 Sep 22; [Epub ahead of print].

- Carro y cols. 2002:** Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1390-7. Epub 2002 Nov 4.
- Carro y cols. 2006b:** Carro E, Trejo JL, Spuch C, Bohl D, Heard JM, Torres-Aleman I. Blockade of the insulin-like growth factor I receptor in the choroid plexus originates Alzheimer's-like neuropathology in rodents: new cues into the human disease? *Neurobiol Aging.* 2006 Nov;27(11):1618-31.
- Carter y cols. 2002:** Carter AB, Price DL Jr, Tucci KA, Lewis GK, Mewborne J, Singh HK. Choroid plexus carcinoma presenting as an intraparenchymal mass. *J Neurosurg.* 2001 Dec;95(6):1040-4.
- Casley y cols. 2002:** Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA. Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J Neurochem.* 2002 Jan;80(1):91-100.
- Castellani y cols. 2002:** Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, Cash AD, Obrenovich ME, Perry G, Smith MA. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2002 Nov 1;70(3):357-60. Review.
- Chapman y cols. 2001:** Chapman PF, Falinska AM, Knevet SG, Ramsay MF. Genes, models and Alzheimer's disease. *Trends Genet.* 2001 May;17(5):254-61. Review.
- Chauhan y cols. 2008:** Chauhan V, Ji L, Chauhan A. Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease. *Biogerontology.* 2008 Dec;9(6):381-9. Epub 2008 Aug 15.
- Chauhan y cols. 1999:** Chauhan VP, Ray I, Chauhan A, Wisniewski HM. Binding of gelsolin, a secretory protein, to amyloid beta-protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 May 10;258(2):241-6.
- Chen y cols. 2005:** Chen RL, Athauda SB, Kassem NA, Zhang Y, Segal MB, Preston JE. Decrease of transthyretin synthesis at the blood-cerebrospinal fluid barrier of old sheep. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005 Jul;60(7):852-8.
- Chittajallu y cols. 1998:** Chittajallu R, Alford S, Collingridge GL. Ca²⁺ and synaptic plasticity. *Cell Calcium.* 1998 Nov-Dec;24(5-6):377-85.
- Christensen y Birn 2002:** Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Apr;3(4):256-66. Review.
- Christensen y cols. 2009:** Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch.* 2009 Oct;458(6):1039-48. Epub 2009 Jun 5.
- Chrysis y cols. 2001:** Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci.* 2001 Mar 1;21(5):1481-9.
- Chun y cols. 1999:** Chun JT, Wang L, Pasinetti GM, Finch CE, Zlokovic BV. Glycoprotein 330/megalin (LRP-2) has low prevalence as mRNA and protein in brain microvessels and choroid plexus. *Exp Neurol.* 1999 May;157(1):194-201.
- Clarke y cols. 1998:** Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1998 Nov;55(11):1449-55.
- Clavaguera y cols. 2009:** Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009 Jul;11(7):909-13. Epub 2009 Jun 7.
- Colangelo y cols. 2002:** Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *J Neurosci Res.* 2002 Nov 1;70(3):462-73.
- Coleman y Yao 2003:** Coleman PD, Yao PJ. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2003 Dec;24(8):1023-7.
- Coles y cols. 1998:** Coles R, Caswell R, Rubinsztein DC. Functional analysis of the Huntington's disease (HD) gene promoter. *Hum Mol Genet.* 1998 May;7(5):791-800.

- Collins y cols. 2006:** Collins NT, Cummins PM, Colgan OC, Ferguson G, Birney YA, Murphy RP, Meade G, Cahill PA. Cyclic strain-mediated regulation of vascular endothelial occludin and ZO-1: influence on intercellular tight junction assembly and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jan;26(1):62-8. Epub 2005 Nov 3.
- Corder y cols. 1993:** Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993 Aug 13;261(5123):921-3.
- Corsellis y cols. 1973:** Corsellis JA, Bruton CJ, Freeman-Browne D. The aftermath of boxing. *Psychol Med.* 1973 Aug;3(3):270-303.
- Cottrell y cols. 2001:** Cottrell DA, Ince PG, Wardell TM, Turnbull DM, Johnson MA. Accelerated ageing changes in the choroid plexus of a case with multiple mitochondrial DNA deletions. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001 Jun;27(3):206-14.
- Cruts y Van Broeckhoven 1998:** Cruts M, Van Broeckhoven C. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat.* 1998;11(3):183-90. Review.
- Cummings 2004:** Cummings JL. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2004 Jul 1;351(1):56-67. Review. No abstract available.
- Daughaday y Rotwein 1989:** Daughaday E, Rotwein P. Insulin like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrin Rev.* 1989. Feb;10(1):68-91. Review.
- Davies y cols. 1987:** Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1987 Apr;78(2):151-64.
- Dávila y Torres-Alemán 2008:** Dávila D, Torres-Aleman I. Neuronal death by oxidative stress involves activation of FOXO3 through a two-arm pathway that activates stress kinases and attenuates insulin-like growth factor I signaling. *Mol Biol Cell.* 2008 May;19(5):2014-25. Epub 2008 Feb 20.
- Deane y cols. 2004:** Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron.* 2004 Aug 5;43(3):333-44.
- DeKosky 2002:** DeKosky ST. Neurobiology and molecular biology of Alzheimer's disease. *Rev Neurol.* 2002 Oct 16-31; 35(8):752-60. Review.
- DeKosky y López 2003:** DeKosky S.T., Lopez O., *Neuropatología de la EA y del deterioro cognitivo leve;* Revista de neurología, ISSN 0210-0010, Vol. 37, Nº. 2, 2003 , pags. 155-163.
- DeKosky y Scheff 1990:** DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 1990 May;27(5):457-64.
- De la Chapelle y cols. 1992:** de la Chapelle A, Tolvanen R, Boysen G, Santavy J, Bleeker-Wagemakers L, Maury CP, Kere J. Gelsolin-derived familial amyloidosis caused by asparagine or tyrosine substitution for aspartic acid at residue 187. *Nat Genet.* 1992 Oct;2(2):157-60.
- De la Monte 2009:** de la Monte SM. Insulin resistance and Alzheimer's disease. *BMB Rep.* 2009 Aug 31;42(8):475-81. Review.
- De la Monte y Wands 2005:** De la Monte SM, Wands JR. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2005 Feb;7(1):45-61.
- De las Cuevas y cols. 2005:** De las Cuevas N, Muñoz U, Hermida OG, Martín-Requero A. Altered transcriptional regulators in response to serum in immortalized lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging.* 2005 May;26(5):615-24.
- De Strooper 2007:** De Strooper B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. *Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease.* *EMBO Rep.* 2007 Feb;8(2):141-6.
- Devi y cols. 2006:** Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci.* 2006 Aug 30;26(35):9057-68.

- Dietrich y cols. 2008:** Dietrich MO, Spuch C, Antequera D, Rodal I, de Yébenes JG, Molina JA, Bermejo F, Carro E. Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging*. 2008 Jun;29(6):902-12. Epub 2007 Feb 26.
- Dobson y cols. 2003:** Dobson CB, Wozniak MA, Itzhaki RF. Do infectious agents play a role in dementia? *Trends Microbiol*. 2003 Jul;11(7):312-7.
- Dominguez y cols. 2004:** Dominguez DI, Hartmann D, De Strooper B. BACE1 and presenilin: two unusual aspartyl proteases involved in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*. 2004;1(4-5):168-74. Review.
- Dudek y cols. 1997:** Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997 Jan 31;275(5300):661-5.
- Eckert y cols. 2003:** Eckert A, Marques CA, Keil U, Schüssel K, Müller WE. Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1010:604-9. Review.
- Eckert y cols. 2001a:** Eckert A, Schindowski K, Leutner S, Luckhaus C, Touchet N, Czech C, Müller WE. Alzheimer's disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2001 Apr;8(2):331-42.
- Eckert y cols. 2001b:** Eckert A, Steiner B, Marques C, Leutz S, Romig H, Haass C, Müller WE. Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *J Neurosci Res*. 2001 Apr 15;64(2):183-92.
- Edmondson y cols. 1995:** Edmondson SR, Werther GA, Russell A, LeRoith D, Roberts CT Jr, Beck F. Localization of growth hormone receptor/binding protein messenger ribonucleic acid (mRNA) during rat fetal development: relationship to insulin-like growth factor-I mRNA. *Endocrinology*. 1995 Oct;136(10):4602-9.
- Eikelenboom y Stam 1982:** Eikelenboom P, Stam FC. Immunoglobulins and complement factors in senile plaques. An immunoperoxidase study. *Acta Neuropathol*. 1982;57(2-3):239-42.
- Elias y cols. 2004:** Elias PK, Elias MF, Robbins MA, Budge MM. Blood pressure-related cognitive decline: does age make a difference? *Hypertension*. 2004 Nov;44(5):631-6.
- Emerich y Borlongan 2009:** Emerich DF, Borlongan CV. Potential of choroid plexus epithelial cell grafts for neuroprotection in Huntington's disease: what remains before considering clinical trials. *Neurotox Res*. 2009 Apr;15(3):205-11. Epub 2009 Feb 24.
- Emerich y cols. 2005:** Emerich DF, Skinner SJ, Borlongan CV, Vasconcellos AV, Thanos CG. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays*. 2005 Mar;27(3):262-74.
- Endres y cols. 1999:** Endres M, Fink K, Zhu J, Stagliano NE, Bondada V, Geddes JW, Azuma T, Mattson MP, Kwiatkowski DJ, Moskowitz MA. Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke. *J Clin Invest*. 1999 Feb;103(3):347-54.
- Evans y cols. 2000:** Evans DB, Rank KB, Bhattacharya K, Thomsen DR, Gurney ME, Sharma SK. Tau phosphorylation at serine 396 and serine 404 by human recombinant tau protein kinase II inhibits tau's ability to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*. 2000 Aug 11;275(32):24977-83.
- Fallin y cols. 2001:** Fallin D, Cohen A, Essioux L, Chumakov I, Blumenfeld M, Cohen D, Schork NJ. Genetic analysis of case/control data using estimated haplotype frequencies: application to APOE locus variation and Alzheimer's disease. *Genome Res*. 2001 Jan;11(1):143-51.
- Fernández y cols. 2007:** Fernandez AM, Fernandez S, Carrero P, Garcia-Garcia M, Torres-Aleman I. Calcineurin in reactive astrocytes plays a key role in the interplay between proinflammatory and anti-inflammatory signals. *J Neurosci*. 2007 Aug 15;27(33):8745-56.
- Fernández y cols. 1997:** Fernandez AM, Garcia-Estrada J, Garcia-Segura LM, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I modulates c-Fos induction and astrogliosis in response to neurotoxic insult. *Neuroscience*. 1997 Jan;76(1):117-22.
- Fernández y cols. 1999:** Fernandez AM, Gonzalez de la Vega AG, Planas B, Torres-Aleman I. Neuroprotective actions of peripherally administered insulin-like growth factor I in the injured olivocerebellar pathway. *Eur J Neurosci*. 1999 Jun;11(6):2019-30.

- Ferrer y cols. 1997:** Ferrer I, Pozas E, Ballabriga J, Planas AM. Strong c-Jun/AP-1 immunoreactivity is restricted to apoptotic cells following intracerebral ibotenic acid injection in developing rats. *Neurosci Res.* 1997 May;28(1):21-31.
- Fiala y cols. 2005:** Fiala M, Lin J, Ringman J, Kermani-Arab V, Tsao G, Patel A, Lossinsky AS, Graves MC, Gustavson A, Sayre J, Sofroni E, Suarez T, Chiappelli F, Bernard G. Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* 2005 Jun;7(3):221-32.
- Figueroa y cols. 2006:** Figueroa S, Oset-Gasque MJ, Arce C, Martinez-Honduvilla CJ, González MP. Mitochondrial involvement in nitric oxide-induced cellular death in cortical neurons in culture. *J Neurosci Res.* 2006 Feb 15;83(3):441-9.
- Fischer y Berner 1991:** Fischer P, Berner P. Clinical and epidemiological aspects of dementia in the elderly. *J Neural Transm Suppl.* 1991;33:39-48.
- Fleming y cols. 2009:** Fleming CE, Mar FM, Franquinho F, Saraiva MJ, Sousa MM. Transthyretin internalization by sensory neurons is megalin mediated and necessary for its neuritogenic activity. *J Neurosci.* 2009 Mar 11;29(10):3220-32.
- Fraser y cols. 1993:** Fraser PE, Lévesque L, McLachlan DR. Biochemistry of Alzheimer's disease amyloid plaques. *Clin Biochem.* 1993 Oct;26(5):339-49. Review.
- Fratiglioni y cols. 1999:** Fratiglioni L, De Ronchi D, Agüero-Torres H. Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging.* 1999 Nov;15(5):365-75. Review.
- Fratiglioni y cols. 1997:** Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, Tontodonati V, Herlitz A, Winblad B. Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology.* 1997 Jan;48(1):132-8.
- Frontczak-Baniewicz y cols. 2006:** Frontczak-Baniewicz M, Andrychowski J, Czernicki Z, Walski M. Involvement of immature endothelial cells in vascular alterations in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2006;44(1):17-23.
- Fukumoto y cols. 2004:** Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC. Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):719-25.
- Furukawa y cols. 1997:** Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1997 Nov 1;17(21):8178-86.
- Galli y cols. 2003:** Galli S, Labato MI, Bal de Kier Joffé E, Carreras MC, Poderoso JJ. Decreased mitochondrial nitric oxide synthase activity and hydrogen peroxide relate persistent tumoral proliferation to embryonic behavior. *Cancer Res.* 2003 Oct 1;63(19):6370-7.
- Gandy 2005:** Gandy S. The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1121-9. Review.
- García y cols. 2007:** García GA, Hernández S, Ramón O, Baez S, García A. Human biology and pathobiology of the absorption and epithelial transport of megacubam. *Rev. Med.* 2007. 15 (1):94-104
- García-Galloway y cols. 2003:** Garcia-Galloway E, Arango C, Pons S, Torres-Aleman I. Glutamate excitotoxicity attenuates insulin-like growth factor-I prosurvival signaling. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Dec;24(4):1027-37.
- Gasche y cols. 2001:** Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Dec;21(12):1393-400.
- Gasparini y cols. 2003:** Gasparini L, Xu H. Potential roles of insulin and IGF-I in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2003 Aug;26(8):404-6.
- Ghiso y cols. 1993:** Ghiso J, Matsubara E, Koudinov A, Choi-Miura NH, Tomita M, Wisniewski T, Frangione B. The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochem J.* 1993 Jul 1;293 (Pt 1):27-30.

- Gibson y cols. 1998:** Gibson GE, Sheu KF, Blass JP. : Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm.* 1998;105(8-9):855-70. Review.
- Giebel y cols. 2005:** Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest.* 2005 May;85(5):597-607.
- Glenner y Wong 1984:** Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 May 16;120(3):885-90.
- Goate y cols. 1991:** Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991 Feb 21;349(6311):704-6.
- Goedert y Spillantini 2006:** Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science.* 2006 Nov 3;314(5800):777-81. Review.
- Goedert y cols. 1992:** Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron.* 1992 Jan;8(1):159-68.
- Gómez-Isla y cols. 1997:** Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1997 Jan;41(1):17-24.
- Gómez Ramos y cols. 2009:** Gómez Ramos A, Ávila J. Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas. Muerte neuronal mediada por la proteína tau a través de receptores muscarínicos. Implicación de tau en la propagación de la enfermedad de Alzheimer. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2009. Monografía XXV. Pag. 276.
- Gonatas y cols. 1967:** Gonatas NK, Anderson W, Evangelista I. The contribution of altered synapses in the senile plaque: an electron microscopic study in Alzheimer's dementia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1967 Jan;26(1):25-39.
- Gotthardt y cols. 2000:** Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J, Herz J. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25616-24.
- Gouras y cols. 2000:** Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR. Intraneuronal Aβ42 accumulation in human brain. *Am J Pathol.* 2000 Jan;156(1):15-20.
- Graves y cols. 1990:** Graves AB, White E, Koepsell TD, Reifler BV, van Belle G, Larson EB, Raskind M. The association between head trauma and Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol.* 1990 Mar;131(3):491-501. Review.
- Greenfield y Bosanquet 1953:** Greenfield JG, Bosanquet FD. The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1953 Nov;16(4):213-26.
- Gronborg y cols. 1993:** Grønborg M, Wulff BS, Rasmussen JS, Kjeldsen T, Gammeltoft S. Structure-function relationship of the insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1993 Nov 5;268(31):23435-40.
- Grossman y cols. 2006:** Grossman H, Bergmann C, Parker S. Dementia: a brief review. *Mt Sinai J Med.* 2006 Nov;73(7):985-92. Review.
- Grundke-Iqbal y cols. 1986:** Grundke-Iqbal I, Vorbrodt AW, Iqbal K, Tung YC, Wang GP, Wisniewski HM. Microtubule-associated polypeptides tau are altered in Alzheimer paired helical filaments. *Brain Res.* 1988 Aug;464(1):43-52.
- Gu y cols. 2002:** Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002 Aug 16;297(5584):1186-90.
- Guevara y cols. 2003:** Guevara C, Barrientos N, Flores A, Idiáquez J. Familiar amyloidotic polyneuropathy type I. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1179-1182.
- Guimerà y cols. 2002:** Guimerà A, Gironès X, Cruz-Sánchez F. Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer *REV ESP PATOL* 2002; Vol 35, n.º 1: 21-48.

- Guo y cols. 1999:** Guo Q, Fu W, Holtsberg FW, Steiner SM, Mattson MP. Superoxide mediates the cell-death-enhancing action of presenilin-1 mutations. *J Neurosci Res.* 1999 Jun 1;56(5):457-70.
- Guo y cols. 1997:** Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, Mattson MP. Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci.* 1997 Jun 1;17(11):4212-22.
- Haass y cols. 1992:** Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, Selkoe DJ.. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 1992 Sep 24;359(6393):322-5.
- Haass y Selkoe 2007:** Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Feb;8(2):101-12.
- Hall y Sara 2006:** Hall K, Sara VR. Growth and somatomedins. *Vitam Horm.* 1983;40:175-233. Además es un importante mitógeno y regulador del ciclo celular y la apoptosis (Velcheti V, Govindan R. Insulin-like growth factor and lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006 Sep;1(7):607-10).
- Hammad y cols. 2000:** Hammad SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 2000 Apr 21;275(16):12003-8.
- Hammad y cols. 1997:** Hammad SM, Ranganathan S, Loukinova E, Twal WO, Argraves WS. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18644-9.
- Hansson y cols. 2009:** Hansson SF, Andréasson U, Wall M, Skoog I, Andreasen N, Wallin A, Zetterberg H, Blennow K. Reduced levels of amyloid-beta-binding proteins in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* 2009 Feb;16(2):389-97.
- Hardy 1997:** Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1997 Apr;20(4):154-9.
- Hardy y Allsop 1991:** Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct;12(10):383-8. Review.
- Hardy y Orr 2006:** Hardy J, Orr H. The genetics of neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 2006 Jun;97(6):1690-9.
- Harkness y cols. 2000:** Harkness KA, Adamson P, Sussman JD, Davies-Jones GA, Greenwood J, Woodroffe MN. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain.* 2000 Apr;123 (Pt 4):698-709.
- Harold y cols. 2009:** Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML et al. "Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease" *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1088-93. Epub 2009 Sep 6.
- Heijmans y cols. 2002:** Heijmans BT, Slagboom PE, Gussekloo J, Droog S, Lagaay AM, Kluft C, Knook DL, Westendorp RG. Association of APOE epsilon2/epsilon3/epsilon4 and promoter gene variants with dementia but not cardiovascular mortality in old age. *Am J Med Genet.* 2002 Jan 22;107(3):201-8.
- Herbert y cols. 1986:** Herbert J, Wilcox JN, Pham KT, Freneau RT Jr, Zeviani M, Dwork A, Soprano DR, Makover A, Goodman DS, Zimmerman EA, et al. Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology.* 1986 Jul;36(7):900-11.
- Hernández y Avila 2008:** Hernández F, Avila J. The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimers' disease. *FEBS Lett.* 2008 Nov 26;582(28):3848-54. Epub 2008 Oct 26.
- Hernández y cols. 2009:** Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ, Avila J. GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol.* 2009 Sep 24. [Epub ahead of print].
- Herz y Bock 2002:** Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:405-34. Epub 2001 Nov 9. Review.

- Himmler 1989:** Himmler A. Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol.* 1989 Apr;9(4):1389-96.
- Hirko y cols. 2007:** Hirko AC, Meyer EM, King MA, Hughes JA. Peripheral transgene expression of plasma gelsolin reduces amyloid in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Ther.* 2007 Sep;15(9):1623-9. Epub 2007 Jul 3.
- Hirokawa y cols. 1988:** Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1449-59.
- Hjalm y cols. 1996:** Hjalm G, Murray E, Crumley G, Harazim W, Lundgren S, Onyango I, Ek B, Larsson M, Juhlin C, Hellman P, Davis H, Åkerström G, Rask L, Morse B. Cloning and sequencing of human gp330, a Ca(2+)-binding receptor with potential intracellular signaling properties. *Eur J Biochem* 1996. 239:132-137.
- Hong y Lee 1997:** Hong M, Lee VM. Insulin and insulin-like growth factor-I regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem.* 1997 Aug 1;272(31):19547-53.
- Hooper y cols. 2008:** Hooper C, Lovestone S, Sainz-Fuertes R. Alzheimer's Disease, Diagnosis and the Need for Biomarkers. *Biomark Insights.* 2008 May 27;3:317-323.
- Hussain y cols. 1991:** Hussain MM, Maxfield FR, Mas-Oliva J, Tabas I, Ji ZS, Innerarity TL, Mahley RW. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/ β 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 1991;266:13936-13940.
- Hussain y cols. 1999:** Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:141-72. Review.
- Hwang y cols. 2004:** Hwang IK, Yoo KY, Park SK, An SJ, Lee JY, Choi SY, Kang JH, Kwon YG, Kang TC, Won MH. Expression and changes of endogenous insulin-like growth factor-I in neurons and glia in the gerbil hippocampus and dentate gyrus after ischemic insult. *Neurochem Int.* 2004 Jul;45(1):149-56.
- Hyman y cols. 2000:** Hyman BT, Strickland D, Rebeck GW. Role of the low-density lipoprotein receptor-related protein in beta-amyloid metabolism and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2000 May;57(5):646-50. Review.
- Ihara y cols. 1986:** Ihara Y, Nukina N, Miura R, Ogawara M. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem.* 1986 Jun;99(6):1807-10.
- Itzhaki 2004:** Itzhaki R. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E and Alzheimer' disease. *Herpes.* 2004 Jun;11 Suppl 2:77A-82A.
- Itzhaki y cols. 1997:** Itzhaki RF, Lin WR, Shang D, Wilcock GK, Faragher B, Jamieson GA. Herpes simplex virus type 1 in brain and risk of Alzheimer's disease. *Lancet.* 1997 Jan 25;349(9047):241-4.
- Itzhaki y cols. 2004:** Itzhaki RF, Wozniak MA, Appelt DM, Balin BJ. Infiltration of the brain by pathogens causes Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004 May-Jun;25(5):619-27. Review.
- Iwatsubo y cols. 1994:** Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron.* 1994 Jul;13(1):45-53.
- Jarrett y cols. 1993:** Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Sep 24;695:144-8. Review.
- Ji y cols. 2008:** Ji L, Chauhan A, Chauhan V. Cytoplasmic gelsolin in pheochromocytoma-12 cells forms a complex with amyloid beta-protein. *Neuroreport.* 2008 Mar 5;19(4):463-6.
- Jiménez y cols. 2001:** Jiménez M, Cano C, Matallana D, Montañés P, Jacquier M. Enfermedad de Alzheimer-Aproximación a la Fisiopatogenia y Presentación de un Caso de Inicio Temprano con la Mutación E280A. Correlación Clinicopatológica y Genética. *Revista de la Asociación Colombiana de Gerontología y Geriatria.* 2001. Vol 15. No 3.

- Judge y cols. 2005:** Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J*. 2005 Mar;19(3):419-21. Epub 2005 Jan 10.
- Julien y Mushynski 1998:** Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998;61:1-23. Review.
- Kaltschmidt y cols. 1997:** Kaltschmidt B, Uherek M, Volk B, Baeuerle PA, Kaltschmidt C. Transcription factor NF-kappaB is activated in primary neurons by amyloid beta peptides and in neurons surrounding early plaques from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2642-7.
- Kaneko y cols. 1995:** Kaneko I, Yamada N, Sakuraba Y, Kamenosono M, Tutumi S. Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. *J Neurochem*. 1995 Dec;65(6):2585-93.
- Kang y cols. 1987:** Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6.
- Kang y cols. 1997:** Kang DE, Saitoh T, Chen X, Xia Y, Masliah E, Hansen LA, Thomas RG, Thal LJ, Katzman R. Genetic association of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene (LRP), an apolipoprotein E receptor, with late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*. 1997 Jul;49(1):56-61.
- Kangas y cols. 1996:** Kangas H, Paunio T, Kalkkinen N, Jalanko A, Peltonen L. In vitro expression analysis shows that the secretory form of gelsolin is the sole source of amyloid in gelsolin-related amyloidosis. *Hum Mol Genet*. 1996 Sep;5(9):1237-43.
- Kantarci y cols. 2007:** Kantarci S, Al-Gazali L, Hill RS, Donnai D, Black GC, Bieth E, Chassaing N, Lacombe D, Devriendt K, Teebi A, Loscertales M, Robson C, Liu T, MacLaughlin DT, Noonan KM, Russell MK, Walsh CA, Donahoe PK, Pober BR. Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet*. 2007 Aug;39(8):957-9. Epub 2007 Jul 15.
- Katzman 1986:** Katzman R. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 1986 Apr 10;314(15):964-73. Review.
- Keil y cols. 2004:** Keil U, Bonert A, Marques CA, Scherping I, Weyermann J, Strosznajder JB, Müller-Spahn F, Haass C, Czech C, Pradier L, Müller WE, Eckert A. Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J Biol Chem*. 2004 Nov 26;279(48):50310-20. Epub 2004 Sep 14.
- Keller y cols. 1998:** Keller JN, Kindy MS, Holtsberg FW, St Clair DK, Yen HC, Germeyer A, Steiner SM, Bruce-Keller AJ, Hutchins JB, Mattson MP. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. 1998 Jan 15;18(2):687-97.
- Kerjaschki y Farquhar 1982:** Kerjaschki D, Farquhar M G. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 September; 79(18): 5557-5561.
- Kerjaschki y Farquhar 1983:** Kerjaschki D, Farquhar MG . Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med*. 1983 Feb 1;157(2):667-86.
- Kim y cols. 2003:** Kim GW, Gasche Y, Grzeschik S, Copin JC, Maier CM, Chan PH. Neurodegeneration in striatum induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: role of matrix metalloproteinase-9 in early blood-brain barrier disruption? *J Neurosci*. 2003 Sep 24;23(25):8733-42.
- Kinoshita y cols. 2001:** Kinoshita A, Whelan CM, Smith CJ, Mikhailenko I, Rebeck GW, Strickland DK, Hyman BT. Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of two sites of interaction between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein: role of the intracellular adapter protein Fe65. *J Neurosci*. 2001 Nov 1;21(21):8354-61.
- Kirazov y cols. 2001:** Kirazov E, Kirazov L, Bigl V, Schliebs R. Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. *Int J Dev Neurosci*. 2001 Jun;19(3):287-96.
- Kiselar y cols. 2003:** Kiselar JG, Janmey PA, Almo SC, Chance MR. Structural analysis of gelsolin using synchrotron protein footprinting. *Mol Cell Proteomics*. 2003 Oct;2(10):1120-32. Epub 2003 Sep 8.

- Klein y Ackerman 2003:** Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(6):785-93. Review.
- Knafo y cols. 2009:** Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Feraud-Espinosa I, Ferrer I, DeFelipe J. Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex.* 2009 Mar;19(3):586-92. Epub 2008 Jul 16.
- Knauer y cols. 1996:** Knauer MF, Orlando RA, Glabe CG. Cell surface APP751 forms complexes with protease nexin 2 ligands and is internalized via the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Brain Res* 1996;740:6-14.
- Kopf y Frölich 2009:** Kopf D, Frölich L. Risk of incident Alzheimer's disease in diabetic patients: a systematic review of prospective trials. *J Alzheimers Dis.* 2009 Apr;16(4):677-85.
- Kounnas y cols. 1993a:** Kounnas MZ, Chappell DA, Strickland DK, Argraves WS. Glycoprotein 330, a member of the low density lipoprotein receptor family, binds lipoprotein lipase in vitro. *J Biol Chem.* 1993 Jul 5;268(19):14176-81.
- Kounnas y cols. 1994:** Kounnas MZ, Haudenschild CC, Strickland DK, Argraves WS. Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo.* 1994 May-Jun;8(3):343-51.
- Kounnas y cols. 1993b:** Kounnas MZ, Henkin J, Argraves WS, Strickland DK. Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular uptake of pro-urokinase. *J Biol Chem.* 1993 Oct 15;268(29):21862-7.
- Kounnas y cols. 1995:** Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK. LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell.* 1995 Jul 28;82(2):331-40.
- Koya y cols. 2000:** Koya RC, Fujita H, Shimizu S, Ohtsu M, Takimoto M, Tsujimoto Y, Kuzumaki N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J Biol Chem.* 2000 May 19;275(20):15343-9.
- Kulakowska y cols. 2008:** Kulakowska A, Drozdowski W, Sadzynski A, Bucki R, Janmey PA. Gelsolin concentration in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and other neurological disorders. *Eur J Neurol.* 2008 Jun;15(6):584-8.
- Kusano y cols. 2000:** Kusano H, Shimizu S, Koya RC, Fujita H, Kamada S, Kuzumaki N, Tsujimoto Y. Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC. *Oncogene.* 2000 Oct 5;19(42):4807-14.
- Kwiatkowski y cols. 1988:** Kwiatkowski DJ, Mehl R, Yin HL. Genomic organization and biosynthesis of secreted and cytoplasmic forms of gelsolin. *J Cell Biol.* 1988 Feb;106(2):375-84.
- Kwiatkowski y cols. 1986:** Kwiatkowski DJ, Stossel TP, Orkin SH, Mole JE, Colten HR, Yin HL. Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature.* 1986 Oct 2-8;323(6087):455-8.
- LaFerla y cols. 1997:** LaFerla FM, Troncoso JC, Strickland DK, Kawas CH, Jay G. Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular Abeta stabilization. *J Clin Invest.* 1997 Jul 15;100(2):310-20.
- Lambert y cols. 2009:** Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1094-9. Epub 2009 Sep 6.
- Laron 2001:** Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol.* 2001 Oct;54(5):311-6.
- Ledesma y cols. 1994:** Ledesma MD, Bonay P, Colaço C, Avila J. Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem.* 1994 Aug 26;269(34):21614-9.
- Lee y cols. 2001:** Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1121-59. Review.
- Lee y cols. 2003:** Lee JM, Yin KJ, Hsin I, Chen S, Fryer JD, Holtzman DM, Hsu CY, Xu J. Matrix metalloproteinase-9 and spontaneous hemorrhage in an animal model of cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* 2003 Sep;54(3):379-82.

- Lemere y cols. 1996:** Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis.* 1996 Feb;3(1):16-32.
- Lendon y cols. 1997:** Lendon CL, Ashall F, Goate AM. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. *JAMA.* 1997 Mar 12;277(10):825-31.
- Letenneur y cols. 1999:** Letenneur L, Gilleron V, Commenges D, Helmer C, Orgogozo JM, Dartigues JF. Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999 Feb;66(2):177-83.
- Levy-Lahad y cols. 1995:** Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 1995 Aug 18;269(5226):973-7.
- Li y Smith 1996:** Li M, Smith CP. Beta-amyloid1-40 inhibits electrically stimulated release of [3H]norepinephrine and enhances the internal calcium response to low potassium in rat cortex: prevention with a free radical scavenger. *Brain Res Bull.* 1996;39(5):299-303.
- Liu y cols. 1993:** Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type I IGF receptor (Igf1r). *Cell.* 1993 Oct 8;75(1):59-72.
- Liu y cols. 2001:** Liu XF, Fawcett JR, Thorne RG, Frey WH 2nd. Non-invasive intranasal insulin-like growth factor-I reduces infarct volume and improves neurologic function in rats following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett.* 2001 Aug 3;308(2):91-4.
- Llorens-Martin y cols. 2009:** Llorens-Martin M, Torres-Alemán I, Trejo JL. Mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis. *Neuroscientist.* 2009 Apr;15(2):134-48.
- Lopes y cols. 2009:** Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Cell cycle re-entry in Alzheimer's disease: a major neuropathological characteristic? *Curr Alzheimer Res.* 2009 Jun;6(3):205-12.
- Lorenzl y cols. 2003:** Lorenzl S, Albers DS, Relkin N, Ngyuen T, Hilgenberg SL, Chirichigno J, Cudkowicz ME, Beal MF. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2003 Aug;43(3):191-6.
- Lorenzo y cols. 2000:** Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA. Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 2000 May;3(5):460-4.
- Luth y cols. 2001:** Lüth HJ, Holzer M, Gärtner U, Staufenbiel M, Arendt T. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res.* 2001 Sep 14;913(1):57-67.
- Lv y cols. 2008:** Lv H, Jia L, Jia J. Promoter polymorphisms which modulate APP expression may increase susceptibility to Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2008 Feb;29(2):194-202. Epub 2006 Nov 16.
- Ma y cols. 2009:** Ma YS, Wu SB, Lee WY, Cheng JS, Wei YH. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Oct;1790(10):1021-9. Epub 2009 May 4.
- Mahley y cols. 1996:** Mahley RW, Nathan BP, Pitas RE. Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Jan 17;777:139-45. Review.
- Malaplate-Armand y cols. 2006:** Malaplate-Armand C, Florent-Bécharde S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T, Pillot T. Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis.* 2006 Jul;23(1):178-89. Epub 2006 Apr 19.
- Mandelkow y cols. 2004:** Mandelkow EM, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E. MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol.* 2004 Oct 11;167(1):99-110. Epub 2004 Oct 4.
- Manczak y cols. 2006:** Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet.* 2006 May 1;15(9):1437-49. Epub 2006 Mar 21.

Mann y cols. 1988: Mann DM, Marcyniuk B, Yates PO, Neary D, Snowden JS. The progresión of the pathological changes of Alzheimer's disease in frontal and temporal neocortex examined both at biopsy and at autopsy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1988 May-Jun; 14(3):177-95.

Marco y Skaper 2006: Marco S, Skaper SD. Amyloid beta-peptide1-42 alters tight junction protein distribution and expression in brain microvessel endothelial cells. *Neurosci Lett.* 2006 Jul 3;401(3):219-24. Epub 2006 Apr 27.

Marqués y cols. 2003: Marques CA, Keil U, Bonert A, Steiner B, Haass C, Muller WE, Eckert A. Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J Biol Chem.* 2003 Jul 25;278(30):28294-302. Epub 2003 May 1.

Marzolo y cols. 2000: Marzolo MP, von Bernhardt R, Bu G, Inestrosa NC. Expression of alpha(2)-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in rat microglial cells. *J Neurosci Res.* 2000 May 1;60(3):401-11.

Marzolo y cols. 2003: Marzolo MP, Yuseff MI, Retamal C, Donoso M, Ezquer F, Farfán P, Li Y, Bu G. Differential distribution of low-density lipoprotein-receptor-related protein (LRP) and megalin in polarized epithelial cells is determined by their cytoplasmic domains. *Traffic.* 2003 Apr;4(4):273-88.

Masters y cols. 1985: Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Jun;82(12):4245-9.

Matsumoto y cols. 2003: Matsumoto N, Kitayama H, Kitada M, Kimura K, Noda M, Ide C. Isolation of a set of genes expressed in the choroid plexus of the mouse using suppression subtractive hybridization. *Neuroscience.* 2003;117(2):405-15.

Matsuoka y cols. 2001: Matsuoka Y, Picciano M, La Francois J, Duff K. Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001;104(3):609-13.

Matsuoka y cols. 2003: Matsuoka Y, Saito M, LaFrancois J, Saito M, Gaynor K, Olm V, Wang L, Casey E, Lu Y, Shiratori C, Lemere C, Duff K. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid. *J Neurosci.* 2003 Jan 1;23(1):29-33.

Mattson 2000: Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Nov;1(2):120-9. Review.

Mattson 2002: Mattson MP. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurovirol.* 2002 Dec;8(6):539-50. Review.

Mattson 2004: Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004 Aug 5;430(7000):631-9.

Mattson y cols. 1992: Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.* 1992 Feb;12(2):376-89.

Mattson y cols. 1998: Mattson MP, Guo Q, Furukawa K, Pedersen WA. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1998 Jan;70(1):1-14. Review.

Maurer y cols. 2000: Maurer I, Zierz S, Möller HJ. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging.* 2000 May-Jun;21(3):455-62.

Maury y cols. 1997: Maury CP, Sletten K, Totty N, Kangas H, Liljeström M. Identification of the circulating amyloid precursor and other gelsolin metabolites in patients with G654A mutation in the gelsolin gene (Finnish familial amyloidosis): pathogenetic and diagnostic implications. *Lab Invest.* 1997 Oct;77(4):299-304.

May y cols. 2007: May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med.* 2007;39(3):219-28.

McGeer y McGeer 1995: McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev.* 1995 Sep;21(2):195-218. Review.

McGeer y McGeer 1996: McGeer PL, McGeer EG. Anti-inflammatory drugs in the fight against Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Jan 17;777:213-20. Review.

- McGeer y McGeer 1998:** McGeer PL, McGeer EG. Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1998;12 Suppl 2:S1-6. Review.
- McGeer y cols. 1988:** McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG. Occurrence of HLA-DR reactive microglia in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;540:319-23.
- McKenzie y cols. 2006:** McKenzie M, Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT. Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients. *J Mol Biol.* 2006 Aug 18;361(3):462-9. Epub 2006 Jul 5.
- McKhann y cols. 1984:** McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984 Jul;34(7):939-44.
- Mecocci y cols. 2002:** Mecocci P, Polidori MC, Cherubini A, Ingegneri T, Mattioli P, Catani M, Rinaldi P, Cecchetti R, Stahl W, Senin U, Beal MF. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002 May;59(5):794-8.
- Melino y cols. 1997:** Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature.* 1997 Jul 31;388(6641):432-3.
- Merched y cols. 1998:** Merched A, Serot JM, Visvikis S, Aguillon D, Faure G, Siest G. Apolipoprotein E, transthyretin and actin in the CSF of Alzheimer's patients: relation with the senile plaques and cytoskeleton biochemistry. *FEBS Lett* 1998; 425(2): 225-228.
- Meyer y cols. 1998:** Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JC. APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1998 Aug;19(4):321-2.
- Moestrup y Verroust 2001:** Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:407-28.
- Moller y cols. 1998:** Möller HJ, Graeber MB. The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1998;248(3):111-22.
- Mori y cols. 2002:** Mori T, Wang X, Aoki T, Lo EH. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2002 Nov;19(11):1411-9.
- Morishima-Kawashima y Ihara 2002:** Morishima-Kawashima M, Ihara Y. Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res.* 2002 Nov 1;70(3):392-401. Review.
- Morita-Fujimura y cols. 2000:** Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Gasche Y, Copin JC, Chan PH. Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Jan;20(1):130-8.
- Morris y cols. 1996:** Morris JC, Storandt M, McKeel DW Jr, Rubin EH, Price JL, Grant EA, Berg L. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology.* 1996 Mar;46(3):707-19.
- Moses y cols. 1990:** Moses AC, Rosen HN, Moller DE, Tsuzaki S, Haddow JE, Lawlor J, Liepnieks J, Nichols WC, Benson MD. A point mutation in transthyretin increases affinity for thyroxine and produces euthyroid hyperthyroxinemia. *J Clin Invest.* 1990 Dec;86(6):2025-33.
- Mullis y cols. 1991:** Mullis PE, Patel MS, Brickell PM, et al. Growth characteristics and response to growth hormone therapy in patients with hypochondroplasia: genetic linkage of the insulin-like growth factor I gene at chromosome 12q23 to the disease in a subgroup of these patients. *Clin Endocrinol* 1991;34:265-74.
- Murialdo y cols. 2001:** Murialdo G, Barreca A, Nobili F, Rollero A, Timossi G, Gianelli MV, Copello F, Rodriguez G, Polleri A. Relationships between cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and insulin-like growth factor-I system in dementia. *J Endocrinol Invest.* 2001 Mar;24(3):139-46.
- Mustafa y cols. 1999:** Mustafa A, Lannfelt L, Lilius L, Islam A, Winblad B, Adem A. Decreased plasma insulin-like growth factor-I level in familial Alzheimer's disease patients carrying the Swedish APP 670/671 mutation. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1999 Nov-Dec;10(6):446-51.

- Nagy 2007:** Nagy Z. The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Apr;1772(4):402-8. Epub 2006 Nov 7. Review.
- Narita y cols. 1997:** Narita M, Holtzman DM, Schwartz AL, Bu G. Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem*. 1997 Nov;69(5):1904-11.
- Nestor y cols. 2004:** Nestor PJ, Scheltens P, Hodges JR. Advances in the early detection of Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2004 Jul;10; Suppl:S34-41.
- Nistor y cols. 2007:** Nistor M, Don M, Parekh M, Sarsoza F, Goodus M, Lopez GE, Kawas C, Leverenz J, Doran E, Lott IT, Hill M, Head E. Alpha- and beta-secretase activity as a function of age and beta-amyloid in Down syndrome and normal brain. *Neurobiol Aging*. 2007 Oct;28(10):1493-506. Epub 2006 Aug 9.
- Nordqvist y Petersson 1996:** Nordqvist A, Petersson CJ. Shoulder injuries common in alcoholics. An analysis of 413 injuries. *Acta Orthop Scand*. 1996 Aug;67(4):364-6.
- Numomura y cols. 2001:** Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Aug;60(8):759-67.
- Nunan y Small 2000:** Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett*. 2000 Oct 13;483(1):6-10.
- Núñez y cols. 2003:** Núñez A, Carro E, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I modifies electrophysiological properties of rat brain stem neurons. *J Neurophysiol*. 2003 Jun;89(6):3008-17. Epub 2003 Feb 5.
- Nuutinen y cols. 2009:** Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, Salminen A. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*. 2009 Oct;61(2):89-104. Epub 2009 Aug 3.
- Nykjaer y Willnow 2002:** Nykjaer A, Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol*. 2002 Jun;12(6):273-80. Review.
- Ocrant y cols. 1990:** Ocrant I, Fay CT, Parmelee JT. Characterization of insulin-like growth factor binding proteins produced in the rat central nervous system. *Endocrinology*. 1990 Sep;127(3):1260-7.
- Ohtake y cols. 2003:** Ohtake K, Maeno T, Ueda H, Ogihara M, Natsume H, Morimoto Y. Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serine/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium. *Pharm Res*. 2003 Nov;20(11):1838-45.
- O'Kusky y cols. 2003:** O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ. Increased expression of insulin-like growth factor I augments the progressive phase of synaptogenesis without preventing synapse elimination in the hypoglossal nucleus. *J Comp Neurol*. 2003 Sep 22;464(3):382-91.
- Orlando y cols. 1997:** Orlando RA, Exner M, Czekay RP, Yamazaki H, Saito A, Ullrich R, Kerjaschki D, Farquhar MG. Identification of the second cluster of ligand-binding repeats in megalin as a site for receptor-ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2368-73.
- Orlando y cols. 1998:** Orlando RA, Rader K, Authier F, Yamazaki H, Posner BI, Bergeron JJ, Farquhar MG. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Oct;9(10):1759-66.
- Ott y cols. 1998:** Ott A, Slioter AJ, Hofman A, van Harskamp F, Witteman JC, Van Broeckhoven C, van Duijn CM, Breteler MM. Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet*. 1998 Jun 20;351(9119):1840-3.
- Page y cols. 1998:** Page KJ, Hollister RD, Hyman BT. Dissociation of apolipoprotein and apolipoprotein receptor response to lesion in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience*. 1998 Aug;85(4):1161-71.
- Palha y cols. 1996:** Palha JA, Moreira P, Wisniewski T, Frangione B, Saraiva MJ. Transthyretin gene in Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett*. 1996 Feb 9;204(3):212-4.

- Panegyres 2001:** Panegyres PK. The functions of the amyloid precursor protein gene. *Rev Neurosci.* 2001;12(1):1-39. Review.
- Paunio y cols. 1994:** Paunio T, Kangas H, Kalkkinen N, Haltia M, Palo J, Peltonen L. Toward understanding the pathogenic mechanisms in gelsolin-related amyloidosis: in vitro expression reveals an abnormal gelsolin fragment. *Hum Mol Genet.* 1994 Dec;3(12):2223-9.
- Pericak-Vance y cols. 1991:** Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Bartlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet.* 1991 Jun;48(6):1034-50.
- Pericak-Vance y cols. 2000:** Pericak-Vance MA, Grubber J, Bailey LR, Hedges D, West S, Santoro L, Kemmerer B, Hall JL, Saunders AM, Roses AD, Small GW, Scott WK, Conneally PM, Vance JM, Haines JL. Identification of novel genes in late-onset Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 2000 Dec;35(9-10):1343-52.
- Perry y cols. 2006:** Perry G., Ávila J., Kinoshita J., Smith M.A. Alzheimer's Disease: A Century of Scientific and Clinical Research. IOS Press. 2006. pag.38-42.
- Perry y cols. 2002:** Perry G, Cash AD, Smith MA. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. *J Biomed Biotechnol.* 2002;2(3):120-123.
- Petrosillo y cols. 2008:** Petrosillo G, Matera M, Casanova G, Ruggiero FM, Paradies G. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Neurochem Int.* 2008 Nov;53(5):126-31. Epub 2008 Jul 9.
- Pietrzik y cols. 2004:** Pietrzik CU, Yoon IS, Jaeger S, Busse T, Weggen S, Koo EH. FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* 2004 Apr 28;24(17):4259-65.
- Poduslo y cols. 1999:** Poduslo JF, Curran GL, Sanyal B, Selkoe DJ. Receptor-mediated transport of human amyloid beta-protein 1-40 and 1-42 at the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 1999 Jun;6(3):190-9.
- Poirier 1994:** Poirier J. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1994 Dec;17(12):525-30.
- Pons y Torres-Alemán 2000:** Pons S, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor-I stimulates dephosphorylation of ikappa B through the serine phosphatase calcineurin (protein phosphatase 2B). *J Biol Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38620-5.
- Popovitch y cols. 1990:** Popovitch ER, Wisniewski HM, Barcikowska M, Silverman W, Bancher C, Sersen E, Wen GY. Alzheimer neuropathology in non-Down's syndrome mentally retarded adults. *Acta Neuropathol.* 1990;80(4):362-7.
- Price 1986:** Price DL. New perspectives on Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.* 1986;9:489-512.
- Qiao y cols. 2005:** Qiao H, Koya RC, Nakagawa K, Tanaka H, Fujita H, Takimoto M, Kuzumaki N. Inhibition of Alzheimer's amyloid-beta peptide-induced reduction of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin. *Neurobiol Aging.* 2005 Jun;26(6):849-55.
- Ray y cols. 2000:** Ray I, Chauhan A, Wegiel J, Chauhan VP. Gelsolin inhibits the fibrillization of amyloid beta-protein, and also defibrillizes its preformed fibrils. *Brain Res.* 2000 Jan 24;853(2):344-51.
- Rebeck y Hyman 1999:** Rebeck C.W., Hyman B.T. Alzheimer's Disease. Eds. Terry R.D., Katzman R., Bick K.L., Sisodin S.S. 1999 p. 340. Lippincott, Williams & Wilkins.
- Reitz y cols. 2007:** Reitz C, den Heijer T, van Duijn C, Hofman A, Breteler MM. Relation between smoking and risk of dementia and Alzheimer disease: the Rotterdam Study. *Neurology.* 2007 Sep 4;69(10):998-1005.
- Richard y Amouyel 2001:** Richard F, Amouyel P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jan 19;412(1):1-12. Review.
- Ridley y cols. 2003:** Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003 Dec 5;302(5651):1704-9.

- Rincon-Choles y cols. 2006:** Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, Bhandari B, Bhandari K, Zhang JH, Wang W, Gorin Y, Barnes JL, Abboud HE. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2006 Apr;55(4):894-900.
- Risch 2000:** Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*. 2000 Jun 15;405(6788):847-56. Review.
- Rivera y cols. 2005:** Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis*. 2005 Dec;8(3):247-68.
- Rocca y cols. 1990:** Rocca WA, Bonaiuto S, Lippi A, Luciani P, Turtù F, Cavarzeran F, Amaducci L. Prevalence of clinically diagnosed Alzheimer's disease and other dementing disorders: a door-to-door survey in Appignano, Macerata Province, Italy. *Neurology*. 1990 Apr;40(4):626-31.
- Rocchi y cols. 2003:** Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull*. 2003 Jun 30;61(1):1-24.
- Rodríguez y cols. 2007:** Rodríguez-de la Rosa L, Contreras-Rodríguez J, Cediell-Algovia R, León Y, Sánchez-Calderón H, Murillo-Cuesta S, Riquelme-Galiana R, de Diego-Sastre JJ, Prim-Espada MP, Varela-Nieto I; Grupo de Neurobiología de la Audición. Neurotrophic action of insulin-like growth factor-I in the inner ear. *Rev Neurol*. 2007 Aug 16-31;45(4):245-50.
- Rogaev y cols. 1995:** Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 1995 Aug 31;376(6543):775-8.
- Rogers y cols. 1999:** Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, Cahill CM, Zhan SS, Potter H, Nilsson LN. Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem*. 1999 Mar 5;274(10):6421-31.
- Roher y cols. 1996:** Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR. Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 1996 Aug 23;271(34):20631-5.
- Rosenberg y cols. 1998:** Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998 Oct;29(10):2189-95.]
- Rosenberg y Yang 2007:** Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus*. 2007 May 15;22(5):E4. Review.
- Rovelet-Lecrux y cols. 2006:** Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006 Jan;38(1):24-6. Epub 2005 Dec 20.
- Russo y cols. 2005:** Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev*. 2005 Dec;26(7):916-43. Epub 2005 Aug 30.
- Saito y cols. 2005:** Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):434-9. Epub 2005 Mar 20.
- Saito y cols. 1994:** Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 11;91(21):9725-9.
- Salehi y cols. 2008:** Salehi Z, Mashayekhi F, Naji M. Insulin like growth factor-1 and insulin like growth factor binding proteins in the cerebrospinal fluid and serum from patients with Alzheimer's disease. *Biofactors*. 2008;33(2):99-106.
- Sarti y cols. 2003:** Sarti P, Arese M, Giuffrè A. The molecular mechanisms by which nitric oxide controls mitochondrial complex IV. *Ital J Biochem*. 2003 Mar;52(1):37-42. Review.
- Saunders 2000:** Saunders AM. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000 Sep;59(9):751-8.

- Saunders 2001:** Saunders AM. Gene identification in Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics*. 2001 Aug;2(3):239-49. Review.
- Sayre y cols. 2001:** Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem*. 2001 Jun;8(7):721-38. Review.
- Scarmeas y cols. 2009:** Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA*. 2009 Aug 12;302(6):627-37.
- Scheff y Price 2003:** Scheff SW, Price DA. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging*. 2003 Dec;24(8):1029-46.
- Scheff y cols. 2005:** Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ. Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006 Oct;27(10):1372-84. Epub 2005 Nov 9.
- Schellenberg y cols. 1992:** Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 1992 Oct 23;258(5082):668-71.
- Scheuner y cols. 1996:** Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996 Aug;2(8):864-70.
- Schwarzman y cols. 1994:** Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, Bhasin R, Silverman J, Weisgraber KH, Coyle PK, et al. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 30;91(18):8368-72.
- Scorer 2001:** Scorer CA. Preclinical and clinical challenges in the development of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*. 2001 Dec 1;6(23):1207-1219.
- Selkoe 1989:** Selkoe DJ. Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 1989;12:463-490. Review.
- Selkoe 1994a:** Selkoe DJ. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17:489-517. Review.
- Selkoe 1994b:** Selkoe DJ. Biochemistry of Alzheimer's disease. En: *Basic Neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects*. Ed: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. Raven Press. 1994a ; 919-933.
- Selkoe 2000a:** Selkoe DJ. The origins of Alzheimer disease: a is for amyloid. *JAMA*. 2000 Mar 22-29;283(12):1615-7.
- Selkoe 2000b:** Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):789-91. Review.
- Selkoe 2001a:** Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 2001 Apr;81(2):741-66. Review.
- Selkoe 2001b:** Selkoe DJ. Presenelin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001b Sep 25;98(20):11039-41. Review.
- Selkoe 2001c:** Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron*. 2001 Oct 25;32(2):177-80.
- Selkoe 2001d:** Selkoe DJ. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis*. 2001 Feb;3(1):75-80.
- Selkoe 2002:** Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(10):1375-81. Review.
- Selkoe 2003:** Selkoe DJ. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res*. 2003 Nov;28(11):1705-13. Review.

Selkoe 2004: Selkoe DJ. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov;6(11):1054-61.

Selkoe 2008: Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res.* 2008 Sep 1;192(1):106-13. Epub 2008 Feb 17.

Selkoe y cols. 1988: Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Oct;85(19):7341-5.

Serot y cols. 2003: Serot JM, Béné MC, Faure GC. Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease. *Front Biosci.* 2003 May 1;8:s515-21.

Serot y cols. 2000: Serot JM, Béné MC, Foliguet B, Faure GC. Morphological alterations of the choroid plexus in late-onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2000 Feb;99(2):105-8.

Seto y cols. 2002: Seto D, Zheng WH, McNicoll A, Collier B, Quirion R, Kar S. Insulin-like growth factor-I inhibits endogenous acetylcholine release from the rat hippocampal formation: possible involvement of GABA in mediating the effects. *Neuroscience.* 2002;115(2):603-12.

Shankar y cols. 2008: Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008 Aug;14(8):837-42. Epub 2008 Jun 22.

Sherrington y cols. 1995: Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1995 Jun 29;375(6534):754-60.

Smale y cols. 1995: Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton WE Jr. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1995 Jun;133(2):225-30.

Smith y cols. 1997: Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, Beckman JS, Perry G. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 1997 Apr 15;17(8):2653-7.

Sonntag y cols. 1999: Sonntag WE, Lynch CD, Bennett SA, Khan AS, Thornton PL, Cooney PT, Ingram RL, McShane T, Brunso-Bechtold JK. Alterations in insulin-like growth factor-I gene and protein expression and type I insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats. *Neuroscience.* 1999 Jan;88(1):269-79.

Sousa y cols. 2000: Sousa, M. M., Norden, A. G. W., Jacobsen, C., Willnow, T. E., Christensen, E. I., Thakker, R. V., Verroust, P. J., Moestrup, S. K. and Saraiva, M. J. Evidence for the role of megalin in renal uptake of transthyretin. *J. Biol. Chem.* 2000;275(49):38176-81.

Speake y cols. 2001: Speake T, Whitwell C, Kajita H, Majid A, Brown PD. Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus. *Microsc Res Tech* 2001;52(1):49-59.

Spiegelgen y cols. 2005: Spiegelgen R, Hammes A, Anzenberger U, Zechner D, Andersen OM, Jerchow B, Willnow TE. LRP2/megalin is required for patterning of the ventral telencephalon. *Development.* 2005 Jan;132(2):405-14.

Stein y cols. 2004: Stein TD, Anders NJ, DeCarli C, Chan SL, Mattson MP, Johnson JA. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci.* 2004 Sep 1;24(35):7707-17.

Stern 2006: Stern Y. Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006 Jul-Sep;20(3 Suppl 2):S69-74. Review.

Stern y cols. 1994: Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA.* 1994 Apr 6;271(13):1004-10.

St George-Hyslop y cols. 1992: St George-Hyslop P, Haines J, Rogaev E, Mortilla M, Vaula G, Pericak-Vance M, Foncin JF, Montesi M, Bruni A, Sorbi S, et al. Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat Genet.* 1992 Dec;2(4):330-4.

- Stopa y cols. 2001:** Stopa EG, Berzin TM, Kim S, Song P, Kuo-LeBlanc V, Rodriguez-Wolf M, Baird A, Johanson CE. Human choroid plexus growth factors: What are the implications for CSF dynamics in Alzheimer's disease? *Exp Neurol*. 2001 Jan;167(1):40-7.
- Stossel 1990:** Stossel, T.P. Actin-membrane interactions in eukaryotic mammalian cells. En: J.F. Hoffman and G. Giebisch, Editors, *Current Topics in Membranes and Transport*, New York Academic Press 1990, 97-107.
- Strazielle y Gershi-Egea 2000:** Strazielle N, Gershi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000 Jul;59(7):561-74. Review.
- Strittmatter y cols. 1993a:** Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 1;90(5):1977-81.
- Strittmatter y cols. 1993b:** Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 1;90(17):8098-102.
- Suhara y cols. 2003:** Suhara T, Magrané J, Rosen K, Christensen R, Kim HS, Zheng B, McPhie DL, Walsh K, Querfurth H. Abeta42 generation is toxic to endothelial cells and inhibits eNOS function through an Akt/GSK-3beta signaling-dependent mechanism. *Neurobiol Aging*. 2003 May-Jun;24(3):437-51.
- Sun y cols. 2002:** Sun YX, Wright HT, Janciauskiene S. Alpha1-antichymotrypsin/Alzheimer's peptide Abeta(1-42) complex perturbs lipid metabolism and activates transcription factors PPARgamma and NFkappaB in human neuroblastoma (Kelly) cells. *J Neurosci Res*. 2002 Feb 15;67(4):511-22.
- Sun y cols. 1999:** Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem*. 1999 Nov 19;274(47):33179-82. Review.
- Suzuki y cols. 2002:** Suzuki T, Tozuka M, Kazuyoshi Y, Sugano M, Nakabayashi T, Okumura N, Hidaka H, Katsuyama T, Higuchi K. Predominant apolipoprotein J exists as lipid-poor mixtures in cerebrospinal fluid. *Ann Clin Lab Sci*. 2002 Fall;32(4):369-76.
- Takuma y cols. 2005:** Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Chen X, Luddy J, Trillat AC, Stern DM, Arancio O, Yan SS. ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):597-8. Epub 2005 Jan 21.
- Talamagas y cols. 2007:** Talamagas AA, Efthimiopoulos S, Tsilibary EC, Figueiredo-Pereira ME, Tzinia AK. Abeta(1-40)-induced secretion of matrix metalloproteinase-9 results in sAPPalpha release by association with cell surface APP. *Neurobiol Dis*. 2007 Dec;28(3):304-15. Epub 2007 Jul 24.
- Tan y cols. 1999:** Tan J, Town T, Suo Z, Wu Y, Song S, Kundtz A, Kroeger J, Humphrey J, Crawford F, Mullan M. Induction of CD40 on human endothelial cells by Alzheimer's beta-amyloid peptides. *Brain Res Bull*. 1999 Sep 15;50(2):143-8.
- Tanna y cols. 1991:** Tanna NK, Kohn MI, Horwich DN, Jolles PR, Zimmerman RA, Alves WM, Alavi A. Analysis of brain and cerebrospinal fluid volumes with MR imaging: impact on PET data correction for atrophy. Part II. Aging and Alzheimer dementia. *Radiology*. 1991 Jan;178(1):123-30.
- Tanzi y Bertram 2001:** Tanzi RE, Bertram L. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron*. 2001 Oct 25;32(2):181-4.
- Tanzi y cols. 2004:** Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron*. 2004 Sep 2;43(5):605-8.
- Teng y Tang 2005:** Teng FY, Tang BL. Widespread gamma-secretase activity in the cell, but do we need it at the mitochondria? *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 4;328(1):1-5.
- Terry y cols. 1964:** Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am J Pathol*. 1964 Feb;44:269-97.
- Terry y Katzman 1983:** Terry RD, Katzman R. Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol*. 1983 Nov;14(5):497-506.
- Terry y Masliah 1994:** Terry RD, Masliah LA. Structural basis of the cognitive alterations in Alzheimer's disease. En: *Alzheimer Disease*. Eds: Terry RD, Katzman R, Bick KL. Raven Press; Ltd, New York. 1994; 179-196.

- Terry y cols. 1991:** Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. 1991 Oct;30(4):572-80.
- Tham y cols. 1993:** Tham A, Nordberg A, Grissom FE, Carlsson-Skewir C, Viitanen M, Sara VR. Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with dementia of the Alzheimer type. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1993;5(3):165-76.
- Thinakaran y Parent 2004:** Thinakaran G, Parent AT. Identification of the role of presenilins beyond Alzheimer's disease. *Pharmacol Res*. 2004 Oct;50(4):411-8.
- Torres y cols. 1995:** Torres MF, Almeida M R, Saraiva MJ. TTR exon scanning in peripheral neuropathies. *Neuromuscul Disord*. 1995 May;5(3):187-91.
- Trejo y cols. 2004:** Trejo JL, Carro E, Lopez-Lopez C, Torres-Aleman I. Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. *Growth Horm IGF Res*. 2004 Jun;14 Suppl A:S39-43. Review.
- Trejo y cols. 2001:** Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*. 2001 Mar 1;21(5):1628-34.
- Trejo y Llorens-Martín 2008:** Trejo JL, Llorens-Martín MV, Torres-Alemán I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Feb;37(2):402-11. Epub 2007 Nov 5.
- Trejo y cols. 2007:** Trejo JL, Piriz J, Llorens-Martin MV, Fernandez AM, Bolós M, LeRoith D, Nuñez A, Torres-Aleman I. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Mol Psychiatry*. 2007 Dec;12(12):1118-28. Epub 2007 Sep 11.
- Troncoso y cols. 1996:** Troncoso JC, Sukhov RR, Kawas CH, Koliatsos VE. In situ labeling of dying cortical neurons in normal aging and in Alzheimer's disease: correlations with senile plaques and disease progression. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996 Nov;55(11):1134-42.
- Tsai y cols. 2004:** Tsai LH, Lee MS, Cruz J. Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 11;1697(1-2):137-42.
- Ulery y Strickland 2000:** Ulery PG, Strickland DK. LRP in Alzheimer's disease: friend or foe? *J Clin Invest*. 2000 Nov;106(9):1077-9.
- Usui y cols. 2009:** Usui K, Hulleman JD, Paulsson JF, Siegel SJ, Powers ET, Kelly JW. Site-specific modification of Alzheimer's peptides by cholesterol oxidation products enhances aggregation energetics and neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3;106(44):18563-8. Epub 2009 Oct 19.
- Valla y cols. 2001:** Valla J, Berndt JD, Gonzalez-Lima F. Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Alzheimer's patients: superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration. *J Neurosci*. 2001 Jul 1;21(13):4923-30.
- Van Praet y cols. 2003:** Van Praet O, Argraves WS, Morales CR. Co-expression and interaction of cubilin and megalin in the adult male rat reproductive system. *Mol Reprod Dev*. 2003 Feb;64(2):129-35.
- Varadarajan y cols. 2000:** Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol*. 2000 Jun;130(2-3):184-208. Review.
- Vardy y cols. 2007:** Vardy ER, Rice PJ, Bowie PC, Holmes JD, Grant PJ, Hooper NM. Increased circulating insulin-like growth factor-I in late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2007 Dec;12(4):285-90.
- Varela-Nieto y cols. 2004:** Varela-Nieto I, Morales-Garcia JA, Vigil P, Diaz-Casares A, Gorospe I, Sánchez-Galiano S, Cañon S, Camarero G, Contreras J, Cediel R, Leon Y. Trophic effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the inner ear. *Hear Res*. 2004 Oct;196(1-2):19-25.
- Vargas y cols. 2009:** Vargas T, Bullido MJ, Martinez-Garcia A, Antequera D, Clarimon J, Rosich-Estrago M, Martin-Requero A, Mateo I, Rodriguez-Rodriguez E, Vilella-Cuadrada E, Frank A, Lleo A, Molina-Porcel L, Blesa R, Combarros O, Gomez-Isla T,

Bermejo-Pareja F, Valdivieso F, Carro E. A megalin polymorphism associated with promoter activity and Alzheimer's disease risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010 Jan 5. [Epub ahead of print]

Vargas y cols. 2008: Vargas T, Ugalde C, Spuch C, Antequera D, Morán MJ, Martín MA, Ferrer I, Bermejo-Pareja F, Carro E. Abeta accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis. *Neurobiol Aging.* 2008 Oct 4. [Epub ahead of print]

Vicario-Abejón y cols. 2003: Vicario-Abejón C, Yusta-Boyo MJ, Fernández-Moreno C, de Pablo F. Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J Neurosci.* 2003 Feb 1;23(3):895-906.

Vidal y cols. 1996: Vidal R, Garzuly F, Budka H, Lalowski M, Linke RP, Brittig F, Frangione B, Wisniewski T. Meningocerebrovascular amyloidosis associated with a novel transthyretin mis-sense mutation at codon 18 (TTRD 18G) *Am J Pathol.* 1996 Feb;148(2):361-6.

Vitek y cols. 1994: Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 24;91(11):4766-70.

Von Bernhardt 2004: The Blood-Brain Barrier and the Pathology of the Central Nervous System: Its importance for the Inflammatory Response. *Rev. chil. neuro-psiquiatr.* 2004 Apr [cited 2009 Sep 14] ; 42(2): 121-130.

Von Bernhardt 2005: Von Bernhardt R. Neurobiological mechanisms of Alzheimer's disease *Rev Chil Neuro-Psiquiat* 2005; 43(2): 123-132.

Waldron y cols. 2008: Waldron E, Heilig C, Schweitzer A, Nadella N, Jaeger S, Martin AM, Weggen S, Brix K, Pietrzik CU. LRP1 modulates APP trafficking along early compartments of the secretory pathway. *Neurobiol Dis.* 2008 Aug;31(2):188-97. Epub 2008 May 3.

Walsh y Selkoe 2004: Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2004 Sep 30;44(1):181-93.

Wang y cols. 2006: Wang CK, Chen CM, Chang CY, Chang KH, Chen IC, Li ML, Lee-Chen GJ, Wu YR. alpha-Synuclein promoter RsaI T-to-C polymorphism and the risk of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2006 Oct;113(10):1425-33. Epub 2006 Apr 11.

Webster y cols. 1999: Webster SD, Tenner AJ, Poulos TL, Cribbs DH. The mouse C1q A-chain sequence alters beta-amyloid-induced complement activation. *Neurobiol Aging.* 1999 May-Jun;20(3):297-304.

Weeds 1982: Weeds A. Actin-binding proteins--regulators of cell architecture and motility. *Nature.* 1982 Apr 29;296(5860):811-6.

Wei y cols. 2009: Wei YH, Wu SB, Ma YS, Lee HC. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J.* 2009 Mar-Apr;32(2):113-32.

Weller y cols. 2002: Weller RO, Yow HY, Preston SD, Mazanti I, Nicoll JA. Cerebrovascular disease is a major factor in the failure of elimination of Abeta from the aging human brain: implications for therapy of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Nov;977:162-8.

Wen y cols. 1996: Wen D, Corina K, Chow EP, Miller S, Janmey PA, Pepinsky RB. The plasma and cytoplasmic forms of human gelsolin differ in disulfide structure. *Biochemistry.* 1996 Jul 30;35(30):9700-9.

Wen y cols. 1999: Wen GY, Wisniewski HM, Kascsak RJ. Biondi ring tangles in the choroid plexus of Alzheimer's disease and normal aging brains: a quantitative study. *Brain Res.* 1999 Jun 19;832(1-2):40-6.

Wicher y cols. 2006: Wicher G, Larsson M, Fex Svenningsen A, Gyllencreutz E, Rask L, Aldskogius H. Low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalín is expressed in oligodendrocytes in the mouse spinal cord white matter. *J Neurosci Res.* 2006 Apr;83(5):864-73.

Wicher y cols. 2005: Wicher G, Larsson M, Rask L, Aldskogius H. Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-2/megalín is transiently expressed in a subpopulation of neural progenitors in the embryonic mouse spinal cord. *J Comp Neurol.* 2005 Nov 14;492(2):123-31.

Willis y cols. 1997: Willis PE, Chadan S, Baracos V, Parkhouse WS. Acute exercise attenuates age-associated resistance to insulin-like growth factor I. *Am J Physiol.* 1997 Mar;272(3 Pt 1):E397-404.

Willnow y cols. 1996: Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK, Herz J. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 6;93(16):8460-4.

Willnow y cols. 1999: Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol.* 1999 Oct;1(6):E157-62. Review.

Wisniewski y cols. 1996: Wisniewski HM, Wegiel J, Kotula L. Review. David Oppenheimer Memorial Lecture 1995: Some neuropathological aspects of Alzheimer's disease and its relevance to other disciplines. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1996 Feb;22(1):3-11. Review.

Wolfe 2007: Wolfe MS. When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 2007 Feb;8(2):136-40.

Wolozin y cols. 1986: Wolozin BL, Pruchnicki A, Dickson DW, Davies P. A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients. *Science.* 1986 May 2;232(4750):648-50.

Woo y cols. 2004: Woo CH, Lim JH, Kim JH. Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J Immunol.* 2004 Dec 1;173(11):6973-80.

Yamaguchi y cols. 1988: Yamaguchi H, Hirai S, Morimatsu M, Shoji M, Harigaya Y. Diffuse type of senile plaques in the brains of Alzheimer-type dementia. *Acta Neuropathol.* 1988;77(2):113-9.

Yammani y cols. 2001: Yammani RR, Seetharam S, Seetharam B. Cubilin and megalin expression and their interaction in the rat intestine: effect of thyroidectomy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Nov;281(5):E900-7.

Yan y cols. 1994: Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, et al. Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 2;91(16):7787-91.

Yang y cols. 2007: Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Apr;27(4):697-709. Epub 2006 Jul 19.

Yin y Stossel 1979: Yin HL, Stossel TP. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature.* 1979 Oct 18;281(5732):583-6. No abstract available.

Yoon y cols. 2005: Yoon IS, Pietrzik CU, Kang DE, Koo EH. Sequences from the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) cytoplasmic domain enhance amyloid beta protein production via the beta-secretase pathway without altering amyloid precursor protein/LRP nuclear signaling. *J Biol Chem.* 2005 May 20;280(20):20140-7. Epub 2005 Mar 16.

Yoshimura y cols. 2003: Yoshimura Y, Ichinose T, Yamauchi T. Phosphorylation of tau protein to sites found in Alzheimer's disease brain is catalyzed by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II as demonstrated tandem mass spectrometry. *Neurosci Lett.* 2003 Dec 26;353(3):185-8.

Zerbinatti y cols. 2004: Zerbinatti CV, Wozniak DF, Cirrito J, Cam JA, Osaka H, Bales KR, Zhuo M, Paul SM, Holtzman DM, Bu G. Increased soluble amyloid-beta peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 27;101(4):1075-80. Epub 2004 Jan 19.

Zhang y cols. 2002: Zhang Y, McLaughlin R, Goodyer C, LeBlanc A. Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol.* 2002 Feb 4;156(3):519-29. Epub 2002 Jan 28.

Zhao y cols. 2009: Zhao WQ, Lacor PN, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL. Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric A β . *J Biol Chem.* 2009 Jul 10;284(28):18742-53.

Zheng y cols. 1994: Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G, McCluskey RT. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem.* 1994 Apr;42(4):531-42.

Zhong y cols. 2005: Zhong J, Deng J, Phan J, Dlouhy S, Wu H, Yao W, Ye P, D'Ercole AJ, Lee WH. Insulin-like growth factor-I protects granule neurons from apoptosis and improves ataxia in weaver mice. *J Neurosci Res.* 2005 May 15;80(4):481-90.

Zhu y cols. 2006: Zhu Y, Hoell P, Ahlemeyer B, Kriegstein J. PTEN: a crucial mediator of mitochondria-dependent apoptosis. *Apoptosis.* 2006 Feb;11(2):197-207.

Zlokovic 1996: Zlokovic BV. Cerebrovascular transport of Alzheimer's amyloid beta and apolipoproteins J and E: possible anti-amyloidogenic role of the blood-brain barrier. *Life Sci.* 1996;59(18):1483-97.

Zlokovic 2002: Zlokovic BV. Vascular disorder in Alzheimer's disease: role in pathogenesis of dementia and therapeutic targets. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002 Dec 7;54(12):1553-9.

Zlokovic 2008: Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008 Jan 24;57(2):178-201.

Zlokovic y cols. 1996: Zlokovic BV, Martel CL, Matsubara E, McComb JG, Zheng G, McCluskey RT, Frangione B, Ghiso J. Glycoprotein 330/megalin: probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30;93(9):4229-34.